

MSC

2.º
CICLO

FCUP
2013

U.PORTO

Síntese de metabolitos de polifenóis presentes no
azeite com atividade hipotensora e citoprotetora

Ivo Almeida

FC

U.PORTO
FACULDADE DE CIÊNCIAS
UNIVERSIDADE DO PORTO

Síntese de metabolitos de polifenóis presentes no azeite com atividade hipotensora e citoprotetora

Ivo Almeida

Dissertação de Mestrado apresentada à
Faculdade de Ciências da Universidade do Porto em
Química
2013

U.PORTO
FACULDADE DE CIÊNCIAS
UNIVERSIDADE DO PORTO

Síntese de metabolitos de polifenóis presentes no azeite com atividade hipotensora e citoprotetora

Ivo Almeida

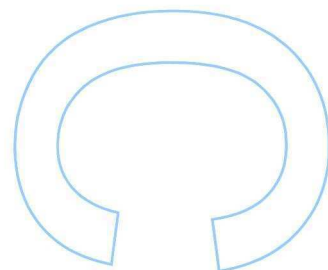
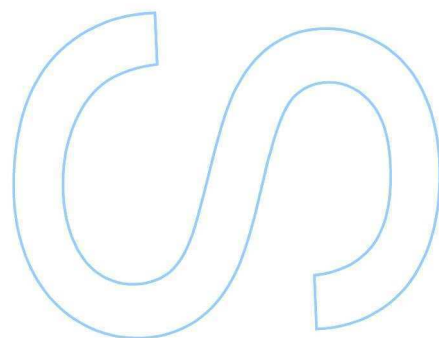
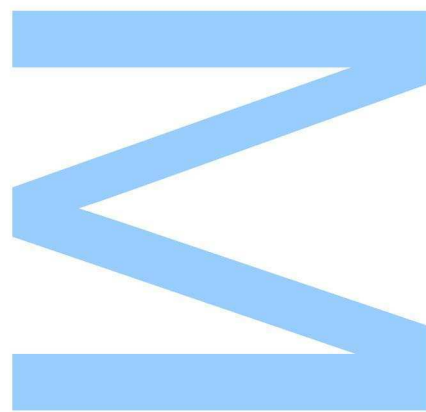
Mestrado em Química
Departamento de Química
2013

Orientador

Prof. Dr.^a Fátima Martins, Prof. Auxiliar, Faculdade de Ciências da
Universidade do Porto

Coorientador

Prof. Dr. Enrique Borges, Prof. Auxiliar, Faculdade de Ciências da
Universidade do Porto

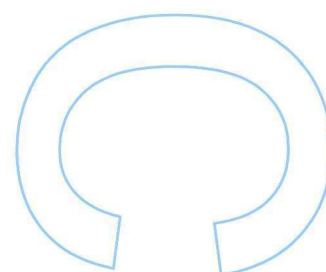
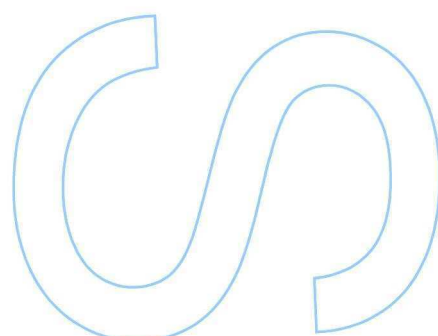
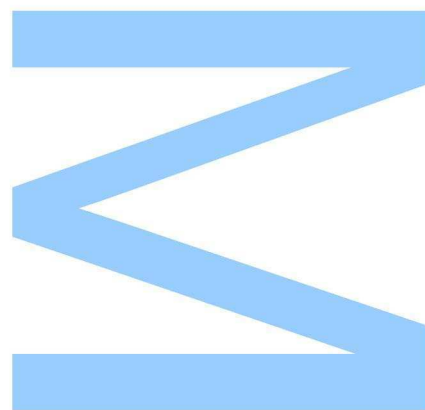




Todas as correções determinadas pelo júri, e só essas, foram efetuadas.

O Presidente do Júri,

Porto, ____/____/____



AGRADECIMENTOS

Começava por agradecer a todos os professores que contribuíram para a minha formação ao longo destes dois ciclos na Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, em especial, à Prof. Dr^a. Maria Fátima Paiva Martins e ao Prof. Dr. Enrique Borges por toda a paciência e dedicação que prestaram ao longo deste último ano.

Queria também agradecer a todos os meus colegas de laboratório que me auxiliaram e guiaram sempre que necessitei de apoio, em especial ao Fábio e à Cidália.

Agradeço aos meus pais, em particular, e a toda a família em geral por me darem sempre o animo, conforto e estabilidade possível para poder concluir esta fase da minha vida.

Por último, e em nada menos importante, quero agradecer à minha namorada, Ana, por toda a paciência e dedicação, por aturar o mau feitio e compreender a falta de tempo, OBRIGADA.

RESUMO

Ao longo dos anos estudos epidemiológicos vêm demonstrando que existe relação direta entre a dieta mediterrânica e a baixa incidência de doenças cardiovasculares, cancerígenas ou neurodegenerativas nesta zona do globo. Para isso contribuirá a presença de compostos polifenólicos com propriedades antioxidantes, anti-tumorais, anti-bacterianas ou anti-virais presentes no azeite, que é a principal fonte de gordura da dieta mediterrânica. Estes compostos fenólicos encontram-se na fase insaponificável do azeite e pertencem a várias classes de fenóis: flavonóides, lignanos, ácidos fenólicos, álcoois fenólicos e secoiridóides. A presença dos compostos polifenólicos combate o stress oxidativo provocado pelos radicais livres nas membranas celulares, sendo um mecanismo de defesa auxiliar ao metabolismo. Contudo para que apresentem actividade biológica *in vivo* é fundamental que sejam biodisponíveis. Assim sendo é imperial que se aprofunde o estudo sobre o azeite, com particular incidência nos seus metabolitos.

Um estudo recente revela que existem dois metabolitos particularmente importantes, sulfato de acetato de hidroxitirosol e sulfato de acetato de álcool homovanílico, devido à sua concentração na corrente sanguínea. Por isso, devido à importância quantitativa que estes dois metabolitos revelam ter, e tendo em conta a inexistência de estudos sobre a capacidade citoprotetora e hipotensora definiu-se como objetivo a síntese destes dois metabolitos como a finalidade de servirem de padrão a futuros estudos.

Por falta de literatura onde fosse possível encontrar informações sobre a sulfatação de fenóis e por questões orçamentais optou-se, em primeiro lugar, por estudar e otimizar as condições de reação da sulfatação dos metabolitos do hidroxitirosol noutro composto presente no azeite que possuísse uma estrutura catecólica semelhante à do hidroxitirosol, deste modo, a escolha recaiu sobre o cafeato de metilo, composto esse já com o procedimento bem descrito em estudos anteriores. Então o primeiro passo foi a síntese do monometilmalonato a partir de metanol e de ácido de Meldrum, que posteriormente foi utilizado na síntese do cafeato de metilo. Após purificação por cromatografia em coluna do cafeato de metilo procedeu-se à sua sulfatação por duas vias sintéticas distintas, numa recorrendo a reagentes de complexo de trióxido de enxofre, como o trióxido de enxofre.piridina ($\text{SO}_3\cdot\text{Py}$) ou o trióxido de enxofre.trietilamina ($\text{SO}_3\cdot\text{TEA}$), e na outra usando ácido clorossulfónico (HClSO_3) como reagente.

Na segunda parte do estudo, partindo do ácido 3,4-dihidroxifenilacético e fazendo-o reagir com LiAlH_4 sintetizou-se o hidroxitirosol, que por sua vez reagindo com cloreto de

acetilo originou acetato de hidroxitirosol. Após a obtenção do acetato de hidroxitirosol puro, obtido por cromatografia em coluna, partiu-se para a sua sulfatação seguindo o método que se achou mais adequado, o do complexo de $\text{SO}_3\cdot\text{Py}$.

Todos os compostos obtidos foram sujeitos a identificação por TLC e RMN, alguns foram ainda analisados por MS.

Este estudo permitiu verificar que é possível a síntese de sulfatação em metabolitos de fase II do azeite, mas necessita de melhoramento no método de isolamento dos mesmos para se obterem puros.

ABSTRACT

Over the years, epidemiological studies have shown that there is a direct relationship between the Mediterranean diet and the low incidence of cardiovascular disease, cancer or neurodegenerative disease in this part of the world. This will contribute to the presence of polyphenolic compounds with antioxidant properties, anti-tumor, anti-bacterial or anti-viral present in the oil, which is the main fat source of the Mediterranean diet. These phenolic compounds are unsaponifiables in the oil phase and belong to several classes of phenols flavonoids, lignans, phenolic acids, alcohols and phenolic secoiridóides. The presence of polyphenolic compounds combat oxidative stress caused by free radicals in cell membranes, as a defense mechanism to help metabolism. However to present biological activity in vivo is critical to provide bioavailable. So is imperial to deepen the study of the oil, with a particular focus on its metabolites.

A recent study shows that there are two particularly important metabolites sulfate, ethyl sulfate, acetate hydroxytyrosol and homovanillic alcohol due to its concentration in the bloodstream. Therefore, due to the quantitative importance of these two metabolites have revealed, and given the lack of studies on the cytoprotective ability and hypotensive set up aiming at the synthesis of these two metabolites as the purpose of serving as a standard for future studies.

By lack of literature where it was possible to find information on the sulfation of phenols and budgetary issues it was decided, first, to study and optimize the reaction conditions of sulfation of metabolites of hydroxytyrosol another compound present in the oil that possess a structure catecólica similar to that of hydroxytyrosol, thus, the choice fell on the methyl caffeate, this compound well as with the procedure described in previous studies. So the first step is the synthesis of methanol from monomethyl malonate and Meldrum's acid, which was subsequently used in the synthesis of methyl caffeate. After purification by column chromatography of methyl caffeate proceeded to their sulfation of two distinct synthetic routes, using a reagent sulfur trioxide complex such as sulfur trioxide.pyridine (Py.SO₃) or sulfur trioxide.triethylamine (TEA.SO₃) and the other using chlorosulfonic acid (HClSO₃) as reactant.

In the second part of the study, starting from 3,4-dihydroxyphenylacetic acid and reacting it with LiAlH₄ was synthesized hydroxytyrosol, which in turn reacts with acetyl chloride afforded hydroxytyrosol acetate. After obtaining the pure hydroxytyrosol acetate,

obtained by column chromatography, left to their sulfation following method was found suitable, the complex $\text{SO}_3\cdot\text{Py}$.

All compounds obtained were subjected to identification by TLC and NMR, some were further analyzed by MS.

This study showed that it is possible synthesis sulfation phase II metabolites in the oil, but need improvement in the isolation method of the same to obtain pure.



LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Composição dos principais ácidos gordos presentes no azeite.....	7
Tabela 2- Famílias da classe dos flavonóides.....	12
Tabela 3- Interpretação do espectro de massa do ião ($m/z=193$) em modo negativo	41
Tabela 4- Caraterização espectroscópica por ^1H -RMN do produto extraído com acetato de etilo após a sulfatação do cafeato de metilo efetuada com complexo trióxido de enxofre.piridina ($\text{SO}_3\cdot\text{Py}$) em piridina	43
Tabela 5- Interpretação do espectro de massa do sulfato do cafeato de metilo (Fig. 37)	46
Tabela 6- Interpretação do espectro de massa do ião ($m/z=273$) em modo negativo (Fig. 38).....	47
Tabela 7- Caraterização espectroscópica por ^1H -RMN dos sais de TEA	50
Tabela 8- Caraterização espectroscópica por ^1H -RMN da sulfatação do acetato de hidroxitirosol.....	54

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estruturas químicas dos carotenóides encontrados no azeite.....	8
Figura 2- Estrutura química de tocoferóis presentes no azeite.....	10
Figura 3- Estrutura química de álcoois fenólicos presentes no azeite.....	10
Figura 4- Estruturas das duas famílias de ácidos fenólicos.....	11
Figura 5- Estrutura geral de Flavonóides.....	12
Figura 6- Estruturas químicas de Lignanós presentes no azeite.....	13
Figura 7- Estrutura química dos secoiridóides presentes na azeitona.....	14
Figura 8- Mecanismo de degradação dos secoiridóides por ação de β -glucosidases endógenas.....	14
Figura 9- Estrutura química de secoiridóides presentes no azeite.....	15
Figura 10- Vias de metabolização do hidroxitirosol.....	20
Figura 11- Esquema de sulfatação pelo método do complexo de $\text{SO}_3\cdot\text{Py}$	22
Figura 12 - Esquema de reação de sulfatação utilizando ácido clorossulfónico.....	22
Figura 13- Esquema da reação da sulfatação utilizando ao ácido sulfúrico.....	23
Figura 14- Mecanismo da reação de sulfatação utilizando o reagente TCE.....	24
Figura 15- Síntese do Hidroxitirosol.....	28
Figura 16- Síntese de acetato de hidroxitirosol.....	29
Figura 17- Síntese geral de cafeato de metilo.....	30
Figura 18- Síntese de malonato de monometilo.....	30
Figura 19- Síntese do cafeato de metilo.....	31
Figura 20- Síntese de sulfatação realizada com complexo $\text{SO}_3\cdot\text{Py}$ em Piridina.....	32
Figura 21- Síntese de sulfatação realizada com complexo $\text{SO}_3\cdot\text{Py}$ em 1,4-dioxano.....	33

Figura 22- Síntese de preparação do trióxido de enxofre.piridina.....	35
Figura 23- Síntese de sulfatação de acetato de hidroxitirosol.....	35
Figura 24- Síntese do Hidroxitirosol.....	38
Figura 25- Síntese de acetato de hidroxitirosol.....	38
Figura 26- Síntese de malonato de monometilo.....	39
Figura 27- Síntese de cafeato de metilo.....	40
Figura 28- Espetro de massa do cafeato de metilo em modo negativo	40
Figura 29- Espetro de massa do ião (m/z=193) em modo negativo	41
Figura 30- Síntese de sulfatação realizada com complexo SO ₃ .Py em Piridina.....	42
Figura 31- Estrutura dos metabolitos sulfatados do cafeato de metilo	42
Figura 32- Intervalo do espetro de ¹ H-RMN da fase de acetato de etilo da sulfatação do cafeato de metilo realizada com complexo SO ₃ .Py em piridina onde é visível a integração dos H-6', H-5' e H-3 dos vários compostos presentes.....	43
Figura 33- Intervalo do espetro de ¹ H-RMN dos cristais resultantes da precipitação da fase aquosa da sulfatação do cafeato de metilo realizada com complexo SO ₃ .Py em piridina onde é indicada a integração dos H-3, H-5' e H-6' dos vários compostos presentes.....	44
Figura 34- Intervalo do espetro de ¹ H-RMN do produto obtido após separação por cc onde é indicada a integração dos H-3, H-5' e H-6' dos vários compostos presentes	44
Figura 35- Estruturas de ressonância em posição <i>para</i>	45
Figura 36- Estruturas de ressonância em posição <i>meta</i>	45
Figura 37- Espetro de massa do sólido obtido na síntese de sulfatação do cafeato de metilo realizada com complexo de SO ₃ .Py em piridina	46
Figura 38- Espetro de massa do ião (m/z=273) em modo negativo	47
Figura 39- Síntese de sulfatação realizada com complexo SO ₃ .Py em 1,4-dioxano.....	47
Figura 40- Intervalo do espetro de ¹ H-RMN do sólido obtido da sulfatação do cafeato de metilo realizada com complexo SO ₃ .Py em 1,4-dioxano onde é indicada a integração dos H-	

3 e H-6' dos vários compostos presentes.....	48
Figura 41- Mecanismo de degradação dos monosulfatos.....	49
Figura 42- Intervalo do espectro de ^1H -RMN do sólido obtido da sulfatação do cafeato de metilo realizada com complexo $\text{SO}_3\cdot\text{Py}$ em 1,4-dioxano após purificação por cc, onde é indicada a integração dos H-3, H-6' e H-5' dos vários compostos presentes.....	50
Figura 43- Síntese de sulfatação realizada com complexo de $\text{SO}_3\cdot\text{TEA}$ em 1,4-dioxano	51
Figura 44- Intervalo do espectro de ^1H -RMN do sólido obtido da sulfatação do cafeato de metilo realizada com ácido clorossulfónico em piridina, onde é indicada a integração dos H-3, H-6' e H-5' dos vários compostos presentes.....	52
Figura 45- Síntese de sulfatação de acetato de hidroxitirosol	53
Figura 46- Estrutura de acetato de hidroxitirosol e seus metabolitos sulfatados.....	54
Figura 47- Intervalo do espectro de ^1H -RMN do sólido obtido da sulfatação do acetato de hidroxitirosol realizada com complexo $\text{SO}_3\cdot\text{Py}$ em 1,4-dioxano, onde é indicada a integração dos H-3, H-6' e H-5' dos vários compostos presentes.....	54

LISTA DE ABREVIATURAS

3,4-DHPG- dihidroxifenilglicol

3,4-DHPEA- hidroxitirosol

3,4-DHPEA-EA- ácido elenólico ligado ao hidroxitirosol

3,4-DHPEA-EDA- forma dialdeídica do ácido elenólico descarboximetilado ligado ao hidroxitirosol

CC- coluna cromatográfica

DEA- dietilamina

DCV- doenças cardiovasculares

DCM- diclorometano

DMA- dimetilaminopiridina

DMF- dimetilformamida

Et₃N- trietilamina

ERA- espécies reativas de azoto

ERO- espécies reativas de oxigénio

ESI- sonda de ionização de electrospray

HyTy- hidroxitirosol

H¹-RMN- Ressonância Magnética Nuclear de protão

MUFA- ácidos gordos monoinsaturados

MS- Espectroscopia de Massa

p-HPEA-EA- ácido elenólico ligado ao tirosol

p-HPEA- tirosol

p-HPEA-EDA- forma dialdeídica do ácido elenólico descarboximetilado ligado ao tirosol

PUFA- ácidos gordos polinsaturados

PA- Para Análise

Py- piridina

R_F- fator de retenção

SFA- ácidos gordos saturados

Ty-EDA- forma dialdeídica do ligstrósido descarboximetilado

TCE- ácido 2,2,2-tricloroetilico clorossulfónico

TEA- trietilamina

THF- tetrahidrofurano

TLC- Cromatografia de Camada Fina

ÍNDICE

Folha de rosto.....	II
Agradecimentos.....	IV
Resumo.....	V
Abstract.....	VII
Lista de tabelas.....	IX
Lista de figuras.....	X
Lista de abreviaturas.....	XIII
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. CONTEXTUALIZAÇÃO	2
1.2. O AZEITE	3
1.2.1. Da colheita à produção	3
1.2.2. Classificação	4
1.2.3. Cor e Sabor	5
1.3. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO AZEITE	6
1.3.1. Ácidos Gordos	6
1.3.2. Antioxidantes	7
1.3.2.1. Carotenóides	8
1.3.2.2. Compostos fenólicos (Polifenóis)	8
1.3.2.2.1. Fenóis Lipofílicos	9
1.3.2.2.2. Fenóis Hidrofílicos	10
1.3.2.2.2.1. Álcoois Fenólicos	10
1.3.2.2.2.2. Ácidos Fenólicos	11
1.3.2.2.2.3. Flavonóides	11
1.3.2.2.2.4. Lignanós	12
1.3.2.2.2.5. Secoiridóides	13
1.4. O CONTRIBUTO DO AZEITE NA SAÚDE HUMANA	15

1.5. BIODISPONIBILIDADE DE COMPOSTOS POLIFENÓLICOS DO AZEITE	18
1.6. SÍNTESES DE SULFATOS	21
2. OBJETIVOS	25
3. MÉTODOS E PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	27
3.1. MÉTODOS E REAGENTES	28
3.2. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	28
3.2.1. Síntese de hidroxitirosol (HyTy).....	28
3.2.2. Síntese de acetato de hidroxitirosol.....	29
3.2.3. Síntese do cafeato de metilo	30
3.2.3.1. Síntese do malonato de monometilo	30
3.2.3.2. Síntese do cafeato de metilo.....	31
3.2.4. Síntese de sulfatação do cafeato de metilo	32
3.2.4.1. Método dos complexos de trióxido de enxofre	32
3.2.4.1.1. Síntese efetuada com complexo trióxido de enxofre.piridina (SO ₃ .Py) em piridina	32
3.2.4.1.2. Síntese realizada com complexo trióxido de enxofre.piridina (SO ₃ .Py) em 1,4-dioxano.....	33
3.2.4.1.3. Síntese realizada com complexo trióxido de enxofre-trietilamina (SO ₃ .TEA) em 1,4-dioxano.....	34
3.2.4.1.4. Síntese realizada com ácido clorossulfónico em piridina.....	34
3.2.4.1.4.1. Preparação do trióxido de enxofre.piridina	35
3.2.4.1.4.2. Sulfatação do cafeato de metilo	35
3.2.5. Síntese de sulfatação do acetato de hidroxitirosol.....	35
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	37
4.1. SÍNTESES DE COMPOSTOS	38
4.1.1. Síntese de hidroxitirosol.....	38
4.1.2. Síntese de acetato de hidroxitirosol.....	38
4.1.3. Síntese de cafeato de metilo	39
4.1.3.1. Síntese do malonato de monometilo.....	39
4.1.3.2. Síntese de cafeato de metilo.....	39
4.2. SÍNTESES DE SULFATAÇÃO DE COMPOSTOS POLIFENÓLICOS	42
4.2.1. Sulfatação do cafeato de metilo.....	42

4.2.1.1. Síntese utilizando complexos de trióxido de enxofre.....	42
4.2.1.1.1. Síntese efetuada com complexo trióxido de enxofre.piridina ($\text{SO}_3\cdot\text{Py}$) em piridina.....	42
4.2.1.1.2. Síntese efetuada com complexo trióxido de enxofre.piridina ($\text{SO}_3\cdot\text{Py}$) em 1,4-dioxano.....	47
4.2.1.1.3. Síntese efetuada com complexo trióxido de enxofre.trietilamina ($\text{SO}_3\cdot\text{TEA}$) em 1,4-dioxano.....	51
4.2.1.1.4. Síntese efetuada com ácido clorossulfónico (ClHSO_3) em piridina.....	52
4.2.1.1.5. Síntese de sulfatação da sulfatação do acetato de hidroxitirosol efetuada com trióxido de enxofre.piridina em 1,4-dioxano.....	53
5. CONCLUSÕES	56
6. BIBLIOGRAFIA	59

1.INTRODUÇÃO



1.1 CONTEXTUALIZAÇÃO

O azeite é proveniente do fruto da oliveira que é membro da família botânica *Oleaceae*, e em concreto da única espécie comestível desta família, a *Olea europaea L.* Esta espécie tem uma variedade de quase mil espécies apresentando características comuns como a coloração verde e a persistência da sua folhagem, bem como o seu tamanho que de modo geral não ultrapassa os 10 metros de altura. As folhas são brilhantes à superfície e acinzentadas no verso, possuem ainda pilosidades de modo a evitar perdas de água. A oliveira é uma árvore de crescimento lento que demora entre 25-30 anos a atingir a maturidade de produção e que pode ter um ciclo de vida de vários séculos chegando em casos extremos a durar um milénio. Este tipo de cultura preferencialmente prolifera em locais de clima temperado, o que faz dos terrenos da bacia mediterrânica excepcionalmente aptos para este tipo de cultura; quer por atingirem temperaturas que rondam os 0°C na época do descanso vegetativo e temperaturas muito elevadas na época de produção, quer por sobreviver com uma taxa de precipitação anual baixa, de cerca de 220 mm. Além disso é uma região constituída por terrenos arenosos ou calcários. Durante a última década do século XX a produção de azeite ascendeu em média a dois milhões de toneladas por ano, assegurando a União Europeia 76% da produção e 72% do seu consumo (Luchetti *et al.*, 2002).

Desde há 6000 anos que várias civilizações da zona da bacia do Mediterrâneo vêm utilizando o azeite como a principal fonte de gordura na sua alimentação, mas não só, também o utilizavam como unguento combustível para iluminação e aquecimento. Embora a larga maioria do azeite seja consumido na União Europeia, mais concretamente pelos países do sul, vem-se notando um crescendo de interesse neste óleo por parte da população dos Estados Unidos da América, Japão, Austrália e Canadá. Este interesse acentuou-se em consequência da crescente popularidade da dieta mediterrânica, que segundo estudos epidemiológicos vem demonstrando uma relação entre esta dieta e a baixa incidência de doenças cardiovasculares, ateroscleróticas, neurológicas e cancerígenas (Konstantinidou *et al.*, 2010; Vissers *et al.*, 2004; Visioli *et al.*, 1995 e 2002).

Até há relativamente pouco tempo pensava-se que a total atividade protetora apresentada pelo azeite era consequência da ação dos ácidos gordos, mais concretamente MUFA's, presentes na fração saponificável (Suárez *et al.*, 2011), que em quantidade pode chegar aos 99% do total do azeite, mas estudos recentes demonstram que na fração insaponificável existem compostos fenólicos responsáveis pelo aumento das HDL e pela diminuição dos danos oxidativos lipídicos.

Pensa-se, que parte destes efeitos benéficos do azeite na saúde humana, são consequência da acção de compostos antioxidantes presentes neste óleo. Vários estudos têm sido realizados neste âmbito devido ao crescente interesse nestes compostos, mas ainda há pouca informação relevante sobre sua biodisponibilidade e atividade biológica. É por isso de suma importância aprofundar este estudo, visando melhor entender os mecanismos de acção e o real contributo que estes compostos tem ao nível da saúde, mais concretamente na prevenção de lesões oxidativas das células, funcionando como elementos citoprotectores e hipotensores.

Os principais compostos fenólicos encontrados no azeite dividem-se em 5 grupos, álcoois fenólicos, ácidos fenólicos, secoiridoides, lignanos e flavonóides, em que cerca de 80% destes compostos pertencem aos grupos dos álcoois fenólicos e secoiridoides. Destes dois grupos fazem parte por exemplo a oleuropeína e seus derivados. Os compostos fenólicos sofrem metabolização e por isso é necessário estudar e avaliar a sua biodisponibilidade, bem como a atividade biológica dos seus metabolitos de fase I e de fase II, de modo a determinar a sua real atividade *in vivo*.

1.2 O AZEITE

O azeite é um óleo extraído do fruto da oliveira, a azeitona. A sua qualidade está relacionada com vários factores, entre os quais o estado de maturação da azeitona, o clima envolvente, a variedade da oliveira, o tipo de solo, a idade da oliveira, o modo como a azeitona é colhida, transportada e armazenada e o método utilizado para a extração do azeite. É o único óleo comestível obtido apenas por extracção física, sem sofrer refinação e possui estabilidade oxidativa quando sujeito a condições normais.

1.2.1 Da colheita à produção

O primeiro passo consiste na determinação da maturidade ideal da azeitona para então realizar a colheita (Luchetti *et al.*, 2002). As azeitonas são então colhidas (5-6 Kg produzem 1L de azeite) devendo estar inteiras, uma vez que se estiverem danificadas sofrem ruptura da sua estrutura celular e por acção conjunta de enzimas com o substrato e ocorre lipólise, oxidação e escurecimento que conduzem ao aumento da acidez e à diminuição da estabilidade (Pereira(b) *et al.*, 2002). Concluída a colheita, as azeitonas devem ser transportadas diretamente para o lagar em caixas de plástico ou vime, abertas ou

perfuradas, que permitam a circulação do ar de modo a refrigerar as azeitonas e evitar o aumento da temperatura e a atividade enzimática. Uma vez no lagar realiza-se a desfolhagem, por sucção ou fortes correntes de ar, e a lavagem com água corrente. O passo seguinte é a moenda, que consiste na trituração das azeitonas em moinhos de pedra ou metálicos, com o objetivo de libertar as gotículas de azeite dos vacúolos, contendo lípidos, formando uma pasta. Estudos revelam que o azeite obtido por moenda em moinhos metálicos em detrimento dos de pedra tem maior concentração de compostos polifenólicos, e que uma dupla moagem combinando moinho de pedra e metálico aumenta a estabilidade oxidativa em relação a uma moagem simples. A pasta obtida é sujeita ao processo de malaxação, que ocorre dentro de uma câmara de aço com um sistema de pás. Este processo de malaxação é utilizado para facilitar a posterior extração do azeite e separação da emulsão azeite/água da fase sólida (bagaço) por aplicação de pressão ou centrifuga. Esta separação do azeite das águas ruças dá-se por centrifugação ou percolação. Durante a malaxação pode ser adicionado à câmara um gás inerte para prevenir a oxidação, e talco micronizado para quebrar as emulsões, aumentar a estabilidade do azeite e causar um ligeiro decréscimo nos níveis de oxidação de triacilgliceróis (TAG's). O último passo é o do armazenamento, no qual se acondiciona o azeite em cubas de aço inoxidável sujeitas a temperaturas situadas no intervalo [15-18]°C, ao abrigo da luz e evitando a sua exposição ao oxigénio de modo a evitar a oxidação (Lidon *et al.*, 2007; Boskou, 2006; Velasco *et al.*, 2002).

1.2.2 Classificação

O azeite é classificado de acordo com a legislação (Regulamento (CE)) n.º 1234/2007 de 22 de Outubro de 2007.

Azeites virgens: obtidos a partir do fruto da oliveira unicamente por processos mecânicos ou outros processos físicos, em condições que não alterem o azeite, e que não tenham sofrido outros tratamentos além da lavagem, da decantação, da centrifugação e da filtração, com exclusão dos azeites obtidos com solventes, com adjuvantes de acção química ou bioquímica ou por processos de reesterificação, bem como de qualquer mistura com óleos de outra natureza.

- Azeite virgem extra: Azeite virgem com uma acidez livre, expressa em ácido oleico, não superior a 0,8 g por 100 g.
- Azeite virgem: Azeite virgem com uma acidez livre, expressa em ácido oleico,

não superior a 2 g por 100 g.

- Azeite lampante: Azeite virgem com uma acidez livre, expressa em ácido oleico, superior a 2 g por 100.

Azeite refinado: Azeite obtido por refinação de azeite virgem, com uma acidez livre expressa em ácido oleico não superior a 0,3 g por 100 g.

Azeite: Azeite obtido por loteamento de azeite refinado e de azeite virgem, com exclusão do azeite lampante, com uma acidez livre, expressa em ácido oleico, não superior a 1 g por 100 g.

Óleo de bagaço de azeitona bruto: Óleo obtido de bagaço de azeitona por tratamento com solventes ou por processos físicos, com exclusão dos óleos obtidos por processos de reesterificação e qualquer mistura com óleos de outra natureza.

Óleo de bagaço de azeitona refinado: Óleo obtido por refinação de óleo de bagaço de azeitona bruto, com uma acidez livre, expressa em ácido oleico, não superior a 0,3 g por 100 g.

Óleo de bagaço de azeitona: Óleo obtido por loteamento de óleo de bagaço de azeitona refinado e de azeite virgem, com exclusão do azeite lampante, com uma acidez livre, expressa em ácido oleico, não superior a 1 g por 100 g.

1.2.3 Cor e sabor

A gama de cores do azeite vai do verde até ao dourado, e deve-se à presença de clorofilas e carotenóides. Quanto mais verde a azeitona na altura da colheita, mais verde será o azeite a que irá dar origem devido à maior concentração de clorofilas presentes, por sua vez, quanto mais madura estiver a azeitona, mais dourado será o azeite por ação de carotenóides.

O sabor do azeite é principalmente conferido pelos compostos voláteis (cetonas, aldeídos, estéres e álcoois) e fenólicos (Morales *et al.*, 1997). A maioria dos compostos voláteis surgem da oxidação lipídica, dependendo de fatores como a maturação e armazenamento das azeitonas e com o próprio tipo de extração utilizado.

1.3 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO AZEITE

O azeite é fundamentalmente composto por duas frações, saponificável e insaponificável. A fração saponificável corresponde a cerca de 98% da composição do azeite, sendo na sua maioria formada por triacilgliceróis, embora contenha também ácidos gordos livres e fosfolípidos. A segunda fração, a insaponificável, corresponde aos restantes 2% do azeite e é constituída por hidrocarbonetos, álcoois alifáticos e triterpénicos, pigmentos (carotenóides e clorofilas), esteróis, tocoferóis, esqualeno e compostos antioxidantes (polifenóis) (Velasco *et al.*, 2002; Luchetti, 2002).

1.3.1 Ácidos gordos

Os ácidos gordos são os constituintes principais do azeite, encontrando-se esterificados sob a forma de triacilgliceróis (TAG's), embora também se possam encontrar na sua forma livre. Quimicamente os ácidos gordos são formados por cadeias hidrocarbonadas saturadas ou insaturadas, e numa das extremidades possuem um grupo carboxílico (Velasco *et al.*, 2002).

Os ácidos gordos podem ser agrupados em três famílias:

- Saturados (SFA): todas as ligações da cadeia carbonada são saturadas;
- Mono-insaturados (MUFA): uma das ligações da cadeia carbonada é insaturada;
- Polinsaturados (PUFA): duas ou mais ligações da cadeia carbonada são insaturadas.

Existem no azeite seis ácidos gordos principais, oleico, linoleico, palmítico, esteárico, palmitoleico e o linolénico (Tabela 1) que vêm o seu teor variar de acordo com condições de cultivo, produção e armazenamento do azeite. O mais importante é o ácido oleico devido ao seu teor e consequentemente à elevada estabilidade que este confere ao azeite. Por este motivo, este ácido gordo serve de referência para a classificação do azeite de acordo com a sua acidez, sendo esta expressa em percentagem.

Tabela 1- Composição dos principais ácidos gordos presentes no azeite

Ácido Gordo	Fórmula de estrutura	Classificação	Teor (%)
Palmítico (C16:0)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$	SFA	7,5-20,0
Palmitoleico(C16:1)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	MUFA	0,3-3,5
Estearico (C18:0)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$	SFA	0,5-5,0
Oleico (C18:1)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	MUFA	55,0-83,0
Linoleico (C18:2)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_2(\text{CH}_2)_6\text{COOH}$	PUFA	3,5-21,0
Linolénico (C18:3)	$\text{CH}_3\text{CH}_2(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_3(\text{CH}_2)_6\text{COOH}$	PUFA	0,0-1,5

1.3.2 Antioxidantes

Durante o metabolismo celular existe formação de radicais livres que são moléculas importantes para o fornecimento de energia, desintoxicação, sinalização química ou funções imunes. O próprio organismo, a nível mitocôndrial, possui mecanismos de defesa eficientes para eliminar esses radicais livres, como por exemplo superóxido dismutase ou glutatona redutase, mas quando estes se encontram em excesso o organismo perde capacidade de resposta e estes compostos podem causar danos oxidativos em biomoléculas proteicas ou lipídicas causando, por exemplo, complicações cardiovasculares ou neoplásicas (El *et al.*, 2009; Boskou, 2006). Quando estas espécies reativas de oxigénio ou azoto se encontram então em excesso é necessário o auxílio de compostos antioxidantes, que são redutores, e que impedem ou retardam a oxidação, inibindo os passos de iniciação e/ou propagação das reações em cadeia da oxidação. Existe duas classes de antioxidantes:

- **Primários ou “chain-breaking”:** por norma são compostos polifenólicos, que inibem a cadeia de reações da oxidação lipídica, por doação de um átomo de hidrogénio aos radicais peróxido que se formam durante a iniciação da oxidação lipídica.
- **Secundários ou preventivos:** compostos que retardam a velocidade de oxidação, por diferentes mecanismos, entre os quais estão a complexação de metais, decomposição de hidroperóxidos para formar espécies não radicalares ou absorção de radiação UV.

Vem sendo crescente o interesse nos compostos antioxidantes naturais, como é o caso dos carotenóides e dos polifenóis (lipofílicos ou hidrofílicos). Os compostos polifenólicos lipofílicos (p.e. tocoferóis) são encontrados em vários óleos alimentares para além do azeite, mas os hidrofílicos (lignanós, secoiridóides, flavonóides, álcoois e ácidos

fenólicos) são compostos exclusivos do azeite (Sánchez-Moreno *et al.*, 1998; Paiva-Martins, 2001).

1.3.2.1 Carotenóides

Os carotenóides são pigmentos lipossolúveis, amarelos, laranjas ou vermelhos, localizados em cloroplastos e cromoplastos de vários frutos ou vegetais. São compostos biossintetizados a partir de unidades de isopreno e alguns deles possuem estrutura cíclica de β -ionona, sendo portanto precursores da vitamina A. Estes compostos estão relacionados em muitos casos com a cor do alimento onde estão inseridos, e com a sua gradual oxidação provocada pelos radicais livres o alimento vai progressivamente vendo a sua cor esbatida.

No azeite, os carotenóides com maior expressão são, maioritariamente, a luteína e o β -caroteno, havendo também a violaxantina em concentrações consideráveis (Fig. 1). No azeite a concentração total de carotenóides varia entre 1 e 20 ppm (Boskou, 1998).

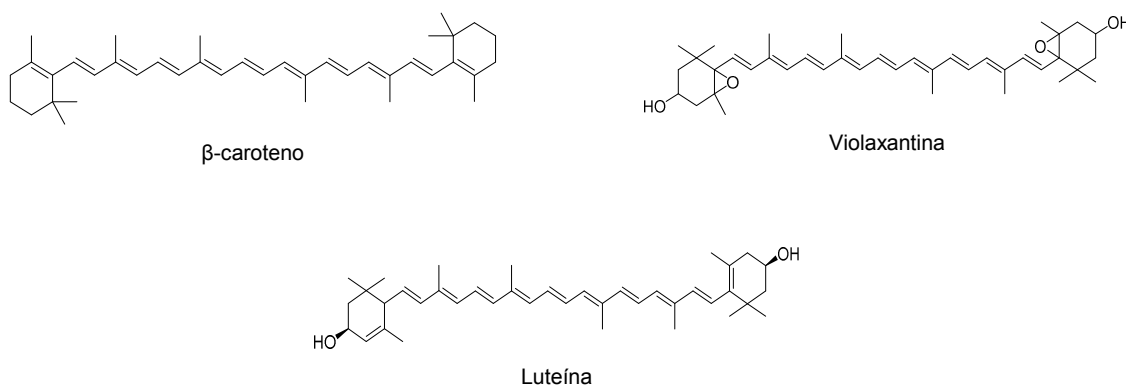


Figura 1 – Estruturas químicas dos carotenóides encontrados no azeite

1.3.2.2 Compostos Fenólicos (Polifenóis)

Os compostos fenólicos contribuem para o sabor, aroma e estabilidade do azeite (Silva *et al.*, 2010).

De um modo quase geral estes compostos têm na sua estrutura um anel aromático e pelo menos um grupo hidroxilo como substituinte, sendo designados por polifenóis. Esta designação é incorreta, uma vez que nem todos os compostos fenólicos apresentam uma estrutura polihidroxifenólica, como é o caso do tirosol que também é englobado na família

dos polifenóis embora só tenham um grupo hidroxilo.

A quantidade destes compostos no azeite tem uma relação directamente inversa com o seu grau de refinação, uma vez que quanto mais refinado for o azeite, menor será a concentração de polifenóis, devido à sua instabilidade térmica e à sua hidrofília (Boskou, 1998).

Os compostos fenólicos são divididos em duas classes:

- **Lipofílicos**, como são exemplo os tocoferóis;
- **Hidrofílicos**, como são exemplos os álcoois e ácidos fenólicos, flavonóides, lignanos e secoiridóides.

1.3.2.2.1 Fenóis lipofílicos

Os tocoferóis apresentam na sua estrutura química uma estrutura cíclica de cromano e a 4 unidades isoprénicas, tendo, o grupo hidroxilo do anel aromático em posição *–para* relativamente ao átomo de oxigénio do cromano.

Os principais compostos fenólicos lipofílicos presentes no azeite são os tocoferóis e os tocotrienóis, sendo que quase 90% corresponde a α -tocoferol (Fig. 2). Este valor percentual varia de acordo a variedade da azeitona, as condições climáticas e do solo, e do processo de colheita (Servili *et al.*, 2009). Geralmente a sua concentração no azeite varia entre poucos ppm e 300 ppm nos azeites de melhor qualidade.

Compostos fenólicos lipofílicos inibem, juntamente com os hidrofílicos, os estádios iniciais de oxidação, embora a sua contribuição seja de menor importância. Contudo, os tocoferóis inibem igualmente a foto-oxidação, contribuindo deste modo para o aumento da estabilidade do azeite, durante o seu armazenamento na presença de luz (Velasco *et al.*, 2002).

A atividade dos tocoferóis está dependente do meio onde estes estão inseridos, e fatores que a influenciam são por exemplo a temperatura, e a presença de metais. A presença de metais, como o ferro e cobre, e uma elevada concentração de radicais livres promovem uma atuação dos tocoferóis como pró-oxidantes (Paiva-Martins, F., 2005 e 2006).

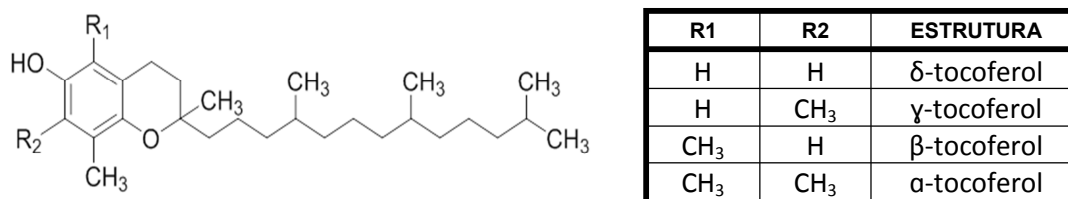


Figura 2 – Estrutura química de tocoferóis presentes no azeite

1.3.2.2.2 Fenóis hidrofílicos

Esta classe de compostos representa os antioxidantes em maior quantidade no azeite virgem e possuem uma estrutura química bastante complexa. É possível dividir estes compostos em diferentes classes de polifenóis, como os secoiridoides, ácidos e álcoois fenólicos, lignanos e flavonóides (Boskou, 1998; Servili *et al.*, 2002; Velasco *et al.*, 2002).

1.3.2.2.2.1 Álcoois fenólicos

No azeite, os álcoois fenólicos que existem com maior expressão são o acetato de hidroxitirosol, o dihidroxifenilglicol (3,4-DHPG), o tirosol (*p*-HPEA) e o hidroxitirosol (3,4-DHPEA) (Fig. 3), sendo os últimos 2 os que se encontram em maior quantidade (González-Correa *et al.*, 2008).

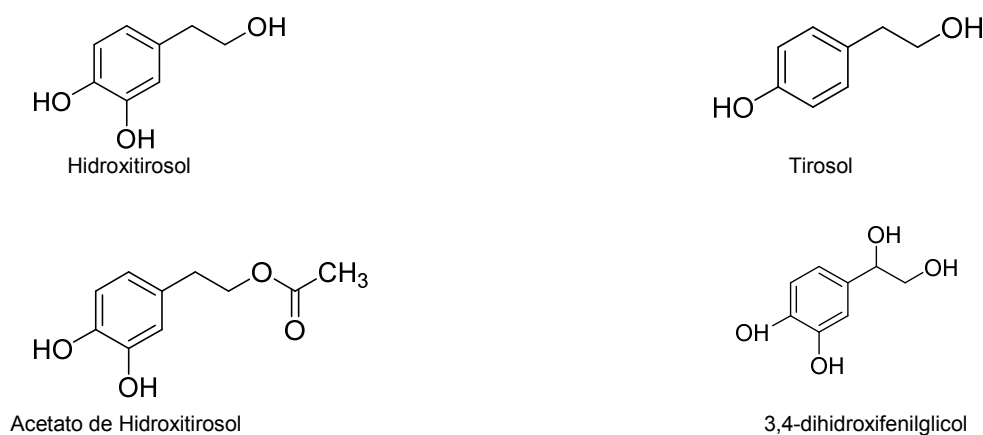


Figura 3 – Estrutura química de álcoois fenólicos presentes no azeite

Regra geral este tipo de compostos tem uma concentração baixa em óleos frescos, contudo, em azeites extraídos a temperatura mais alta, com azeitonas muito maduras, ou durante o armazenamento ocorre hidrólise de secoiridóides, que possuem na sua estrutura

p-HPEA ou 3,4-DHPEA, o que conduz a um aumento da concentração destes dois álcoois. A gama de concentrações de 3,4-DHPEA varia no azeite extra-virgem entre 1,4-14,4 mg/kg e no azeite refinado é de 1,7 mg/kg; já o *p*-HPEA tem concentração média de 27,4 mg/kg no azeite extra-virgem e 3 mg/kg no azeite refinado (Tuck *et al.*, 2002).

1.3.2.2.2 Ácidos fenólicos

Os ácidos fenólicos são compostos polares que podem ser divididos em duas classes, os ácidos hidroxibenzóicos (C6-C1) e os ácidos hidroxicinâmicos (C6-C3) (Fig. 4). No azeite, os ácidos hidroxibenzóicos presentes em maior quantidade, são o ácido gálico, vanílico e sirínico. Por sua vez, os ácidos hidroxicinâmicos presentes em maior quantidade no azeite, são o ácido cafeico, ferúlico e sinápico (Robards *et al.*, 1999).



Figura 4- Estruturas das duas famílias de ácidos fenólicos

Comparando as duas classes de ácidos fenólicos, os hidroxicinâmicos tem mostrado possuir maior poder antioxidante que os hidroxibenzóicos correspondentes. Provavelmente tal acontece devido à presença do grupo CH=CH-COOH conjugado com o anel aromático, que garante melhor capacidade de estabilização do radical. (Balasundram *et al.*, 2006).

1.3.2.2.3 Flavonóides

Este tipo de compostos apresenta configuração do tipo C6-C3-C6. O seu esqueleto é formado por dois anéis aromáticos (A e B), unidos geralmente por um anel heterocíclico (C) (Fig. 5).

Por terem na sua estrutura dois anéis aromáticos com grupos hidroxilo, os flavonóides são antioxidantes naturais poderosos, que por poderem ser multi-substituídos tem a capacidade de formar estruturas muito diversificadas. Sendo então possível agrupar os flavonóides em várias famílias, como por exemplo flavonóis, flavonas, isoflavonas, flavanóis (ou catequinas), antocianinas ou antocianidinas (Tabela 2).

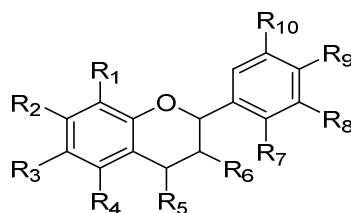


Figura 5- Estrutura geral de Flavonóides

Tabela 2- Famílias da classe dos flavonóides

Substituintes	Flavonóis	Flavonas	Catequinas	antocianinas
R1	H	H	H	H
R2	OH	OH	OH	OH
R3	H	H	H	H
R4	OH	OH	OH	OH
R5	=O	=O	H	H
R6	OH	H	OH	OH
R7	H	H	H	H
R8	H	H	OH	H
R9	OH	OH	OH	OH
R10	OH	H	H	OH

No azeite os flavonóides presentes em maior concentração são da família das flavonas, a luteolina e apigenina, mas comparativamente com outros polifenóis têm baixa concentração (Paiva-Martins *et al.*, 2002).

A atividade antioxidante dos flavonóides está, como nos polifenóis em geral, relacionada com o grau de hidroxilação e respetiva posição dos grupos hidroxilos, mais especificamente no anel aromático B e no anel heterocíclico.

1.3.2.2.4 LIGNANOS

Os compostos pertencentes a esta classe que se encontram em maior quantidade no azeite são o (+)-1-pinoresinol, o (+)-1-acetoxipinoresinol (Fig. 6) e o (+)-1-hidroxipinoresinol e podem atingir uma concentração de 100 mg/kg nos azeites virgens. Existem estudos contraditórios quanto à atividade antioxidante demonstrada pelos lignanos. Os lignanos apresentam atividade antioxidante muito reduzida comparativamente com outros compostos

fenólicos (Carrasco-Pancorbo, A., 2007).

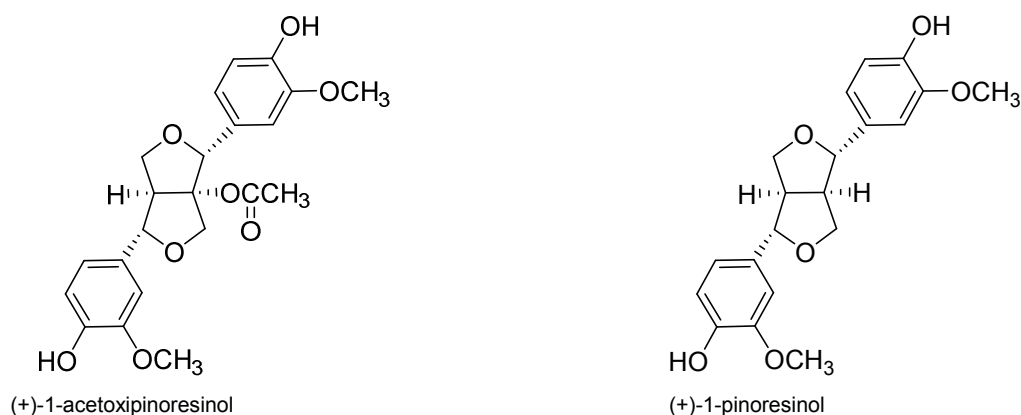


Figura 6- Estruturas químicas de Lignanos presentes no azeite

Owen em 2000 mostrou haver uma relação entre a capacidade antioxidante do azeite virgem e a concentração de lignanos nele contido; fato que não é contestado é o dos lignanos serem a classe de compostos polifenólicos mais resistentes a tratamentos térmicos (Servili *et al.*, 2009).

1.3.2.2.5 SECOIRIDÓIDES

Estes compostos são exclusivos da família *Oleaceae*, à qual pertence o género *Olea europaea* L. (oliveira). Além disso, estes são os compostos fenólicos que existem em maior quantidade no azeite, sendo, por isso, de elevado interesse para este trabalho. Apesar de serem exclusivos das oliveiras, estes compostos não se encontram uniformemente dispersos pelos produtos que desta advêm. Por exemplo, o nezunido, só existe no caroço, enquanto a oleuropeína (éster de ácido elenólico com hidroxitirosol), o ligstrósido (éster de ácido elenólico com tirosol) e a desmetiloleuropeína são os secoiridóides presentes em maior concentração na azeitona (Fig. 7) e nas folhas da oliveira, podendo a oleuropeína atingir 73% do total de polifenóis identificados nas folhas de oliveira (varia entre 6-9% da matéria seca), ou 14% da matéria seca em frutos jovens (El *et al.*, 2009; Servili *et al.*, 2009; Lavelli *et al.*, 2005).

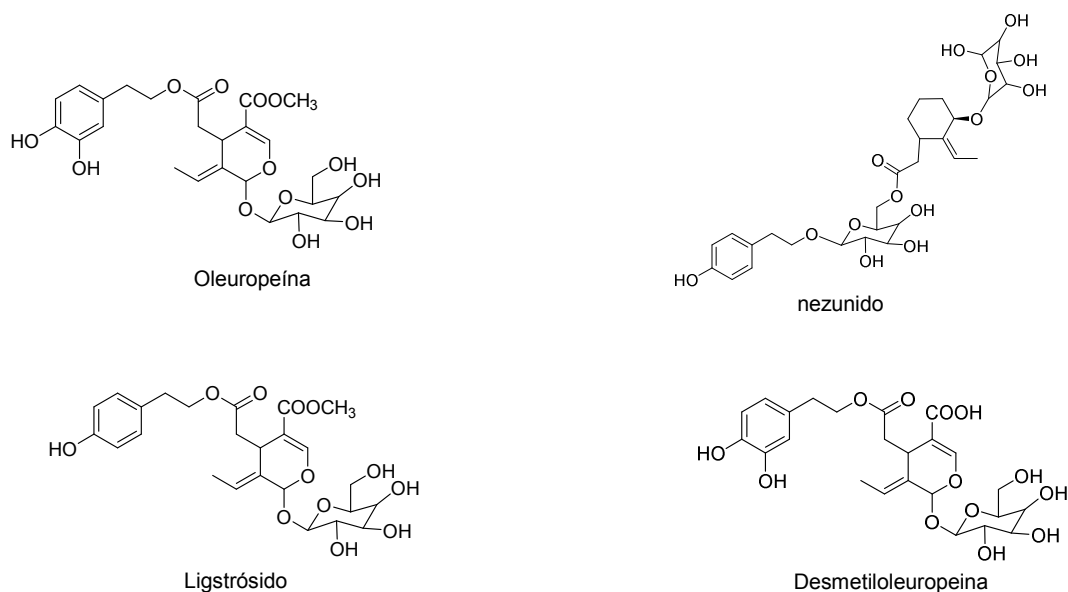


Figura 7 – Estrutura química dos secoiridóides presentes na azeitona

Durante os processos de extracção mecânica do azeite (moenda e malaxação) os secoiridóides sofrem hidrólise catalisada por β -glucosidases endógenas, o que conduz a uma degradação dos secoiridóides glicosilados e consequente transformação nos seus derivados agliconados (Fig.8).

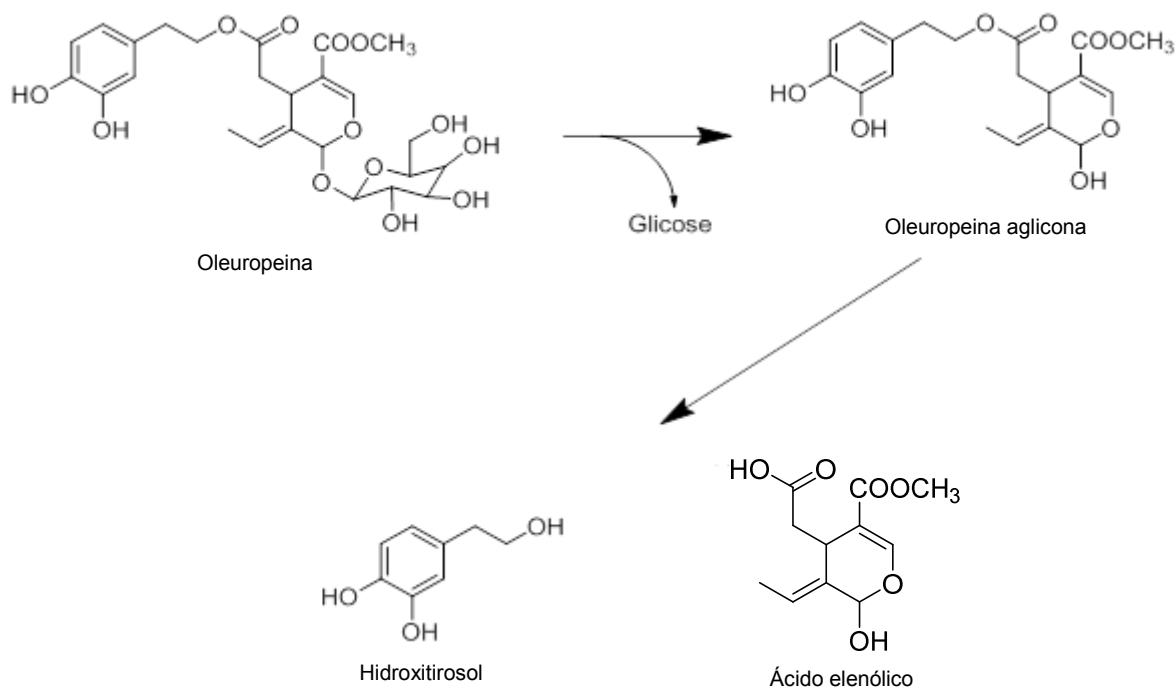


Figura 8- Mecanismo de degradação dos secoiridóides por ação de β -glucosidases endógenas

No azeite virgem, os derivados da oleuropeína e de ligstrósido, são os fenóis que se encontram em maior quantidade, como o 3,4-DHPEA-EDA (forma dialdeídica do ácido elenólico descarboximetilado ligado ao hidroxitirosol), o *p*-HPEA-EDA (forma dialdeídica do ácido elenólico descarboximetilado ligado ao tirosol); os isómeros de aglicona da oleuropeína, como o 3,4-DHPEA-EA (ácido elenólico ligado ao hidroxitirosol) e isómeros da aglicona do ligstrósido, como o *p*-HPEA-EA (ácido elenólico ligado ao tirosol) (Paiva-Martins *et al.*, 2001; Bendini *et al.*, 2007; Servili *et al.*, 2009) (Fig.9).

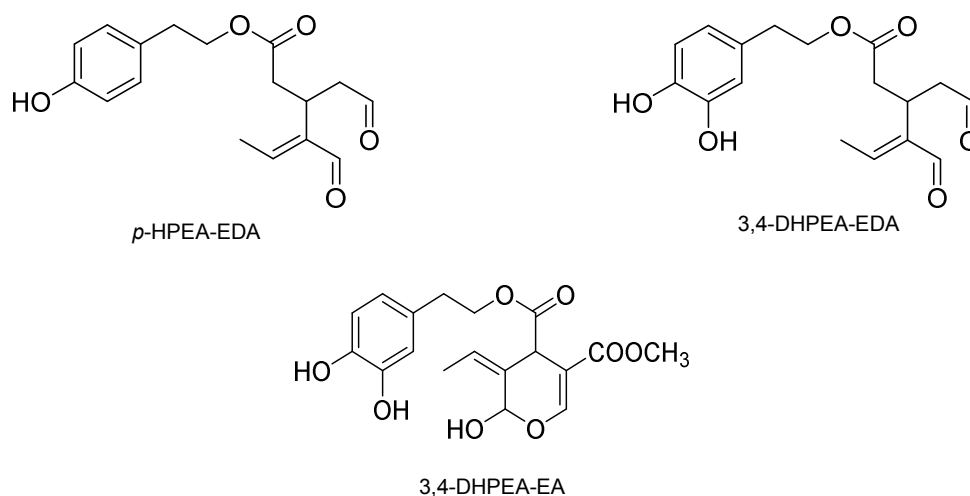


Figura 9 – Estrutura química de secoiridóides presentes no azeite

Durante o armazenamento do azeite, os derivados do secoiridóides agliconados, por ação de mecanismos hidrolíticos, sofrem nova degradação que leva à formação de hidroxitirosol e tirosol; são estes processos hidrolíticos, de natureza enzimática ou não-enzimática que levam ao aumento da concentração destes dois álcoois fenólicos durante o processo de produção e armazenamento do azeite.

A nível organoléptico, estes compostos fenólicos têm influência direta no sabor do azeite, estando relacionados com a amargura e pungência do azeite (Bendini *et al.*, 2007; Servili *et al.*, 2009; Migliorini *et al.*, 2012).

1.4 O CONTRIBUTO DO AZEITE NA SAÚDE HUMANA

O aumento da esperança de vida e a baixa taxa de mortalidade por causas cardíacas (DCV) nos países da bacia do mediterrâneo comparativamente com países mais desenvolvidos do norte da Europa foram documentados sem nunca serem conhecidas as

causas, até que em 1970, Ancel Keys, divulgou um estudo realizado em 7 países que apontava a dieta realizada nos países mediterrânicos como sendo a grande responsável pela boa saúde dos habitantes desta região. Esta teoria foi suportada por vários estudos epidemiológicos que se lhe seguiram.

Posto isto, e sabendo que a dieta mediterrânica tem um alto teor de gorduras (na Grécia esse valor chega a 40% de todas as calorias ingeridas), vêm sendo levados a cabo vários estudos sobre o seu contributo na saúde. Sendo o azeite a principal fonte de gordura utilizada pelos sulistas europeus, é sobre si que recaem a maioria dos estudos e análises, que vem demonstrando os seus efeitos benéficos na saúde (na prevenção de doenças cardiovasculares, osteoporose, alguns cancros, entre outras). Esta capacidade preventiva está relacionada com a composição química, uma vez que o azeite é um óleo maioritariamente constituído por ácidos monoinsaturados (ácido oleico), e por compostos minoritários com elevada capacidade antioxidante.

Sendo o azeite um óleo extremamente rico em ácidos gordos, supunha-se que estes seriam os responsáveis pelos contributos benéficos do azeite para a saúde, com especial incidências para o ácido oleico (MUFA) e ácido linoleico (PUFA). A substituição de SFA's por MUFA's ou PUFA's na dieta seguida por humanos leva à diminuição nos níveis plasmáticos de LDL. Contudo, sabendo que as espécies reativas de oxigénio (ERO) e azoto (ERA), embora essenciais em várias funções metabólicas do organismo (Boskou, 2006), podem também atacar as ligações duplas dos ácidos gordos insaturados, iniciando deste modo a formação de peróxidos lipídicos, virou-se a atenção para os constituintes minoritários do azeite, como os compostos fenólicos, devido à sua conhecida elevada capacidade antioxidante (Harwood *et al.*, 2002; Covas, 2007).

A principal causa de desenvolvimento de problemas cardiovasculares deve-se à oxidação das LDL que têm um papel fundamental na formação de placa aterosclerótica, e à diminuição das HDL. A aterosclerose é uma doença inflamatória caracterizada pela formação de ateromas nas artérias; estes ateromas são formados pela acumulação de lípidos, cálcio e tecidos fibrosos, que causam um espessamento e endurecimento dos tecidos que formam o interior da artéria (intima) e originam obstrução da mesma, reduzindo o fluxo sanguíneo, de tal modo, que poem em causa o normal funcionamento de órgãos como o coração. A oxidação de lípidos ou lipoproteínas inseridas nas LDL resultam em variações conformacionais, que conduzem a um não reconhecimento das LDL pelos seus recetores específicos. Deste modo mantem-se em circulação levando ao aumento concentração das LDL no sangue. Por outro lado as LDL modificadas tornam-se mais suscetíveis que as LDL

nativas de serem captadas pelos macrófagos e originarem células esponjosas, dando início à formação da placa aterosclerótica. A zona circundante da placa aterosclerótica é extremamente pró-inflamatória e trombogénica, uma vez que devido ao aumento de espessamento e perda de elasticidade da íntima surgem fissuras e hemorragias com formação de coágulos de onde poderá ocorrer a libertação de trombos com consequências muito graves ou mesmo fatais no caso de obstruir uma artéria e provocar um enfarte do miocárdio (no caso de uma trombose coronária), ou um acidente vascular cerebral (no caso de uma trombose nas artérias carótidas) (Harwood *et al.*, 2002; Covas, 2007).

Posto isto é crucial saber como prevenir a aterosclerose e sabe-se que compostos polifenólicos presentes no azeite, como o hidroxitirosol e a oleuropeína, inibem efetivamente o primeiro passo da formação da placa aterosclerótica, ou seja, a oxidação das LDL (Visioli *et al.*, 1995; Fitó *et al.*, 2000; Aviram, 1996).

Verificou-se igualmente que estes compostos inibem mecanismos que conduzem à agregação plaquetária, nomeadamente a síntese de tromboxano B2 e a atividade enzimática de COX2 (Petroni *et al.*, 1995; González-Correa *et al.*, 2008; Rosignoli *et al.*, 2013).

A nível bactericida os compostos fenólicos também se mostram interventivos, em especial o hidroxitirosol e a oleuropeína que demonstram capacidade de combater infeções do trato respiratório ou intestinal, tanto provocadas por bactérias como fungos. Atribui-se a capacidade antibactericida destes compostos polifenólicos e igualmente à sua estrutura *ortho*-catecólica (Bisignano *et al.*, 1999). Mais recentemente um estudo *in vitro*, levado a cabo por Romero *et al.*, comprovou que secoiridóides agliconados, particularmente a forma dialdeídica do ligstrósido descarboximetilado (Ty-EDA), apresenta grande atividade contra as estirpes da bactéria *Helicobacter pylori*, relacionadas com úlceras e câncros gástricos (Waterman *et al.*, 2007; Romero *et al.*, 2007).

O azeite tem também atividade como agente anticancerígeno, uma vez que alguns dos seus ácidos gordos e compostos minoritários previnem/combatem vários tipos de cancro, como o cancro da mama (Waterman *et al.*, 2007; Warleta *et al.*, 2011; Bartsch *et al.*, 1999; Elamin *et al.*, 2013), da próstata (Acquaviva *et al.*, 2012; Pauwels *et al.*, 2011; Carrillo *et al.*, 2012), da pele (Waterman *et al.*, 2007; Ishihashi *et al.*, 2003) ou do cólon em qualquer uma das suas 3 principais fases (iniciação, propagação e metástases) (Pereira-Caro *et al.*, 2013).

A oleuropeína e o hidroxitirosol foram considerados também potenciais compostos

benéficos no tratamento da diabetes, por esta ser uma doença de stress oxidativo provocada pela hiperglicemia, e estes dois compostos fenólicos possuem elevada capacidade antioxidante (Jemai *et al.*, 2009).

A oleuropeína, hidroxitirosol e seus derivados apresentam ainda capacidade citoprotetoras dos eritrócitos, inibindo o stress oxidativo e posterior hemólise celular. Sendo a principal função destas células o transporte de oxigénio e podendo o oxigénio produzir aniões superóxidos, é importante que existam mecanismos de defesa além dos intrínsecos que protejam os eritrócitos como demonstrou Paiva-Martins *et al.* (2010). Os compostos fenólicos que demonstram maior capacidade antioxidante na prevenção contra os danos oxidativos provocados em eritrócitos são os mais lipofílicos, uma vez que conseguem penetrar melhor a membrana celular e assim atuar diretamente no interior da célula onde existem ERO (Paiva-Martins *et al.*, 2013; Zrelli *et al.*, 2011) demonstraram também a capacidade do hidroxitirosol em inibir a disfunção endotelial.

Oleuropeína e Ty-EDA também se mostraram potenciais compostos bioativos na prevenção de doenças neurodegenerativas, como é o caso da doença de Alzheimer (Pitt *et al.*, 2009).

Tendo por base todos os motivos supra citados, a adição de azeite à dieta humana acarreta inúmeros benefícios para a saúde. Por avaliação de vários estudos levados a cabo por vários centros de investigação em todo o mundo, pode-se considerar o azeite um alimento funcional, por ser particularmente rico em polifenóis.

Na generalidade dos casos de estudo, as quantidades administradas dos compostos presentes no azeite, ou do próprio azeite em si, são consideravelmente inferiores às utilizadas nesses estudos. Contudo, sendo o azeite um alimento que na zona da bacia do Mediterrâneo se utiliza diariamente na confeção dos mais variados alimentos, poderá ocorrer uma acumulação em determinados tecidos, e deste modo produzir efeito protector. Tendo em atenção que a concentração efetiva no plasma sanguíneo de compostos do azeite é fundamental para o seu potencial de atuação, é de suma importância saber a bioatividade de todos os metabolitos conhecidos, e por isso é crucial estabelecer estudos nesse sentido.

1.5 BIODISPONIBILIDADE DE COMPOSTOS POLIFENÓLICOS DO AZEITE

O termo biodisponibilidade foi originalmente usado em farmacologia para definir o

conceito da “taxa/velocidade e extensão na qual o fármaco atinge o seu local de ação”. Também se pode entender o termo biodisponibilidade como a fração de um nutriente ou compostos bioativo que atinge o sistema circulatório e o local específico onde vai exercer atuação biológica. Durante a metabolização, uma molécula sofre alterações estruturais que lhe facilitam o atravessamento de membranas biológicas, ou que facilitam a sua excreção pelos fluídos corporais, tais como urina ou suor; no fundo, a metabolização proporciona uma alteração da polaridade da molécula, tornando-a mais lipofílica ou hidrofílica.

Os compostos fenólicos são absorvidos no trato intestinal, estando sujeitos a uma extensa metabolização, principalmente no epitélio intestinal e fígado, mas também nos rins. Estes podem sofrer metabolismo de fase I e/ou fase II, que são mecanismos importantes na desintoxicação e eliminação de xenobióticos facilitando a sua excreção na bília e urina. Um dos principais alvos das atenções devido à sua elevada capacidade antioxidante e citoprotetora tem sido o hidroxitirosol (HyTy), que vem sendo largamente estudado e analisado de modo a melhor compreender o seu percurso e metabolismo no organismo.

Vários estudos de biodisponibilidade demonstram que o hidroxitirosol é bem absorvido pelo intestino e vários dos seus metabolitos, como os seus glucoronídeos e sulfatos, o álcool e ácido homovanílico, podem ser encontrados no plasma e urina (Fig.10).

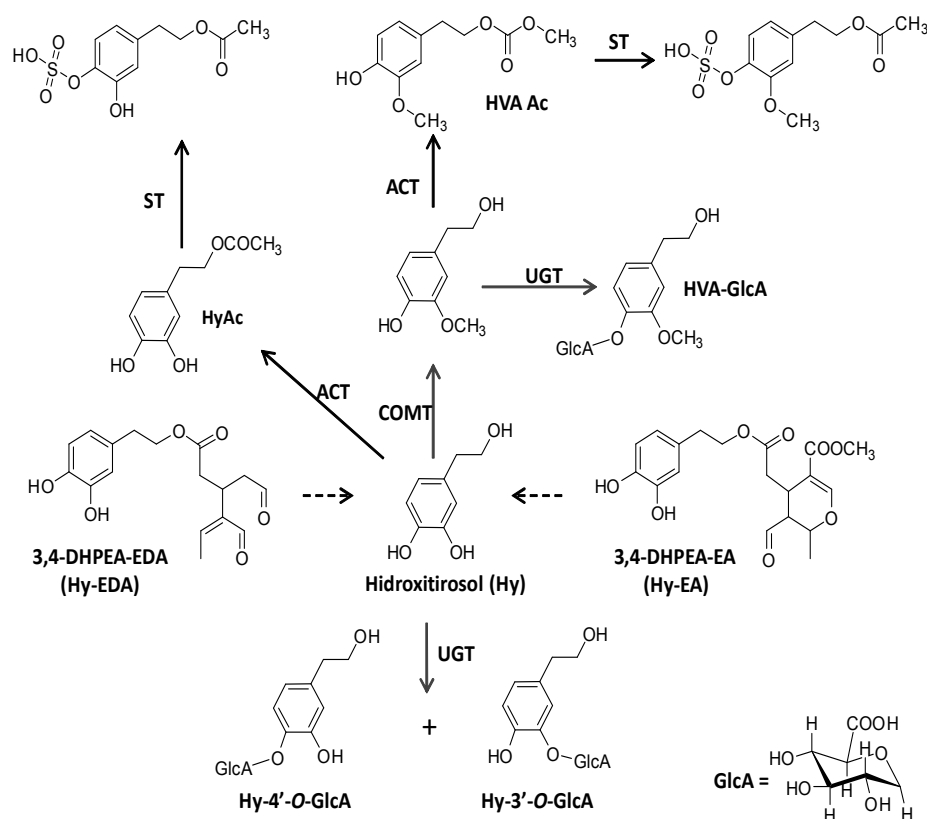


Figura 10- Vias de metabolização do hidroxitirosol

Parte dos ácidos e álcoois surgem no trato gastro-intestinal por hidrólise ácida de secoiridóides no estômago, devido ao pH aproximado de 2 ou por ação da flora intestinal no intestino (Suarez *et al.*, 2011) como é o caso da oleuropeína. Contudo existem secoiridóides, como o 3,4-DHPEA-EDA e 3,4-DHPEA-EA, que são relativamente estáveis tanto às condições ácidas do estômago, como às condições alcalinas do intestino delgado (Paiva-Martins *et al.*, 2011).

Até recentemente, os estudos de biodisponibilidade efetuados para os secoiridóides, os principais polifenóis do azeite, eram inexistentes, mas trabalhos recentes tem demonstrado que secoiridóides derivados do HyTy, são igualmente absorvidos e sofrem também hidrólise com produção de HyTy.

Após ingestão de azeite o metabolito que se encontra em maior concentração no plasma é o sulfato de acetato de hidroxitirosol (de la Torre *et al.*, 2012). A sulfatação em humanos ocorre principalmente no fígado e é catalisada pelas sulfotransferases, que

catalisam a transferência do grupo sulfonilo da fosfoadenosina-fosfossulfato para os grupos hidroxilo do catecol dos polifenóis.

Ultimamente vem-se considerando igualmente a acetilação como metabolismo de fase II, realizado por aciltransferases que catalisam a transferência de grupos acetil a partir da Coenzima-A (Rubió(b), 2012) e é uma das principais vias metabólicas do hidroxitirosol e seus derivados, que sendo mais lipofílicos que o HyTy, atravessam o epitélio intestinal (de la Torre *et al.*, 2012) mais facilmente.

Embora existam já vários estudos realizados para melhor se compreender os mecanismos metabólicos e a distribuição dos metabolitos pelo organismo, ainda existe um escasso conhecimento sobre estes metabolitos e a sua bioatividade. Isto deve-se à falta de compostos padrões dos metabolitos, que permitam estudar a biodisponibilidade e bioatividade dos metabolitos recuperados do organismo.

1.6 SÍNTESE DE SULFATOS

Os metabolitos sulfatados são conhecidos como metabolitos de fase II, e são um dos principais mecanismos biológicos desintoxicantes usados pelo organismo para tornar os metabolitos mais hidrofílicos e facilitar a sua excreção do organismo.

Os estudos realizados sobre os metabolitos do azeite sulfatados do azeite são ainda incipientes, tornando esta área de estudo muito aliciante e propicia a novas descobertas, uma vez que foi recentemente confirmado que muitos dos principais metabolitos do azeite aparecem na urina e no plasma na sua forma conjugada com sulfato, e mais ainda, que o principal metabolito do azeite, em termos de concentração, se encontra sulfatado. Infelizmente ainda não existem padrões de metabolitos sulfatados e essa é uma das conquistas que se deve conseguir a curto prazo, para permitir iniciar o estudo da absorção, metabolização, distribuição e excreção dos metabolitos sulfatados do azeite. Mesmo ao que à literatura diz respeito, as fontes são muito escassas ou mesmo inexistentes, existem alguns estudos sobre a sulfatação de estruturas catecólica ou possuidoras de grupos hidroxilo em moléculas que as possuem na sua estrutura química (Yang *et al.*, 2013).

Um dos métodos utilizados para a síntese de sulfatação de grupos hidroxilo, utiliza como reagente complexos de trióxido de enxofre (SO_3) devido à sua reatividade e selectividade para átomos de oxigénio e de azoto. Os mais comuns são o trióxido de enxofre-piridina (SO_3Py), trióxido de enxofre-dimetilformamida (SO_3DMF), e o trióxido de

enxofre.trietilamina ($\text{SO}_3\cdot\text{TEA}$). Regra geral os solventes usados nas reações são polares apróticos. A reação ocorre em meio anidro, com um excesso de 6-10 equivalentes molares de complexo SO_3 relativamente ao composto fenólico e com uma temperatura não muito elevada para evitar a degradação do composto fenólico (Fig.11)

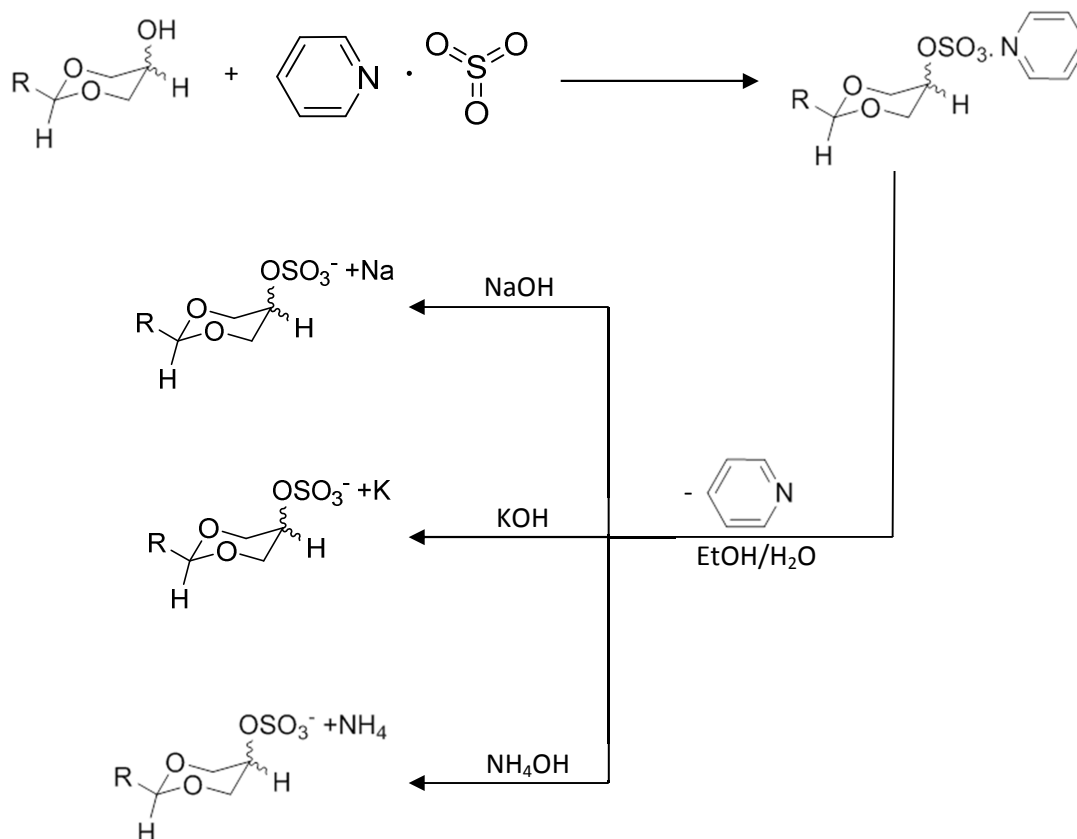


Figura 11- Esquema de sulfatação pelo método do complexo de $\text{SO}_3\cdot\text{Py}$

Outro dos métodos de sulfatação usual é o do ácido clorossulfónico (ClSO_3H), que utiliza como reagente o ácido clorossulfónico. A reação é realizada num solvente orgânico polar aprótico, geralmente piridina, em meio anidro e é formada por duas etapas. A primeira etapa é a de preparação do ácido sulfónico e a segunda é a sulfatação do composto fenólico. A quantidade de ácido clorossulfónico é 10 vezes superior à do composto fenólico, e neste método, as temperaturas utilizadas na reação de sulfatação são um pouco elevadas, isso pode causar degradação do composto fenólico (Fig.12).

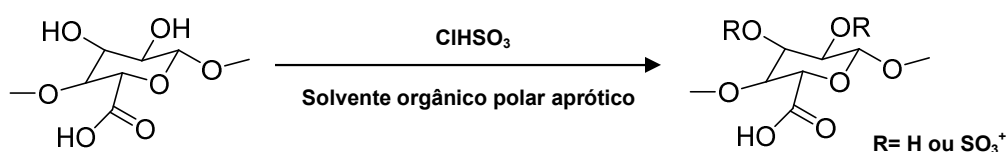


Figura 12- Esquema de reação de sulfatação utilizando ácido clorossulfónico

Outros dos métodos utilizados para realizar a sulfatação de grupos hidroxilo é com recurso ao ácido sulfúrico (Fig.13).

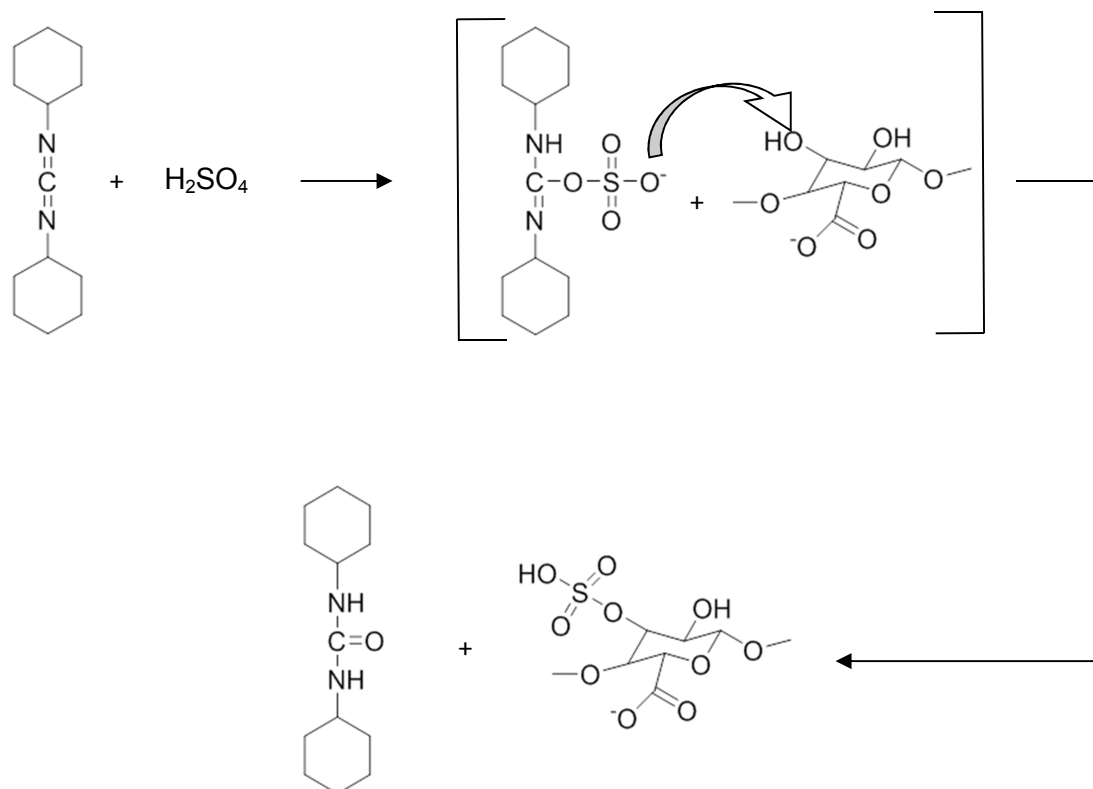


Figura 13- Esquema da reação da sulfatação utilizando ao ácido sulfúrico

Na última década, vem sendo reportado um novo método de sulfatação de grupos hidroxilo, utilizando como reagente ácido 2,2,2-tricloroetilico clorossulfónico (TCE). A reação é realizada em meio anidro e utilizando solvente orgânico polares apróticos, geralmente tetrahydrofurano (THF). Juntamente com o reagente TCE são utilizados dois equivalentes de trietilamina (Et_3N) e um equivalente de dimetilaminopiridina (DMAP) (Fig. 14). Esta primeira fase é de proteção do grupo hidroxilo, mas no fundo comporta-se como reação de sulfatação. Uma segunda fase é de desproteção, usando como agente desprotetor o formato de amónio. Não se remove todo o grupo protetor mas apenas a parte do TCE, permanecendo o ácido sulfónico ligado à molécula orgânica, isto é possível porque o formato de amónio além de atuar como fornecedor de hidrogénios, também serve de tampão à clivagem da ligação S-O do éster resultante. Esta reação é realizada a temperaturas baixas, aproximadamente de $0^\circ C$, e o produto é armazenado sob a forma de sal (Liu *et al.*, 2004).

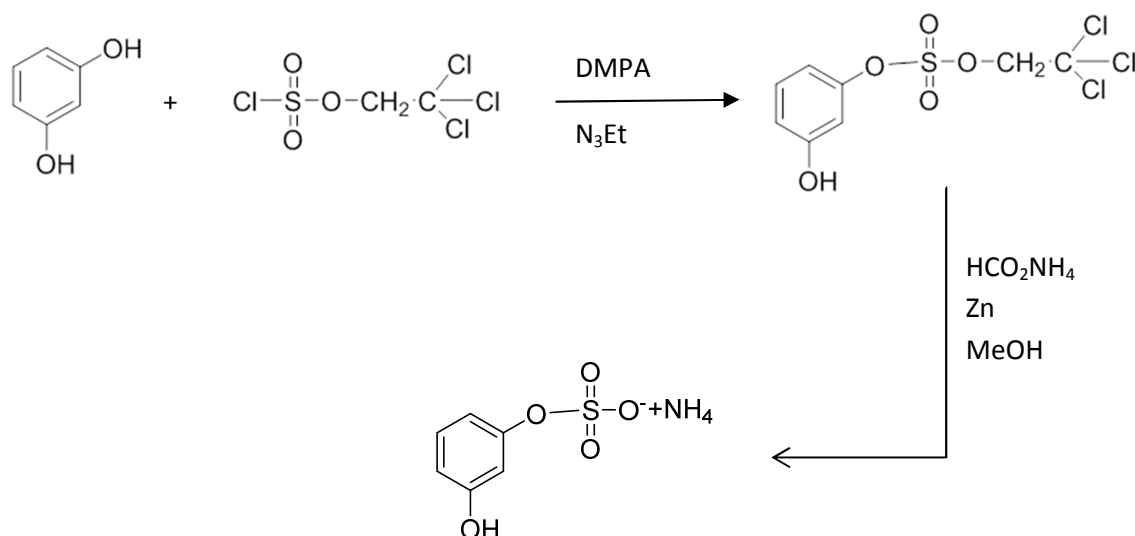


Figura 14- Mecanismo da reação de sulfatação utilizando o reagente TCE

O fato de as condições reacionais das sínteses de sulfatação, serem muitas vezes heterogêneas, afeta o grau de sulfatação das moléculas, mas além disso, ainda agrava o fato de os sulfatos livre ou na forma de sal serem compostos altamente polares, o que dificulta a sua purificação e consequente isolamento, para evitar essa contrariedade o método que utiliza TCE só introduz o grupo sulfato já no fim da síntese.

O método dos complexos SO_3 é, comparativamente com o do ácido clorossulfónico, mais suave e menos destrutivo, o que para compostos antioxidantes pouco estáveis como é o caso dos compostos fenólicos, é uma vantagem. Contudo, quando comparado com o método do éster de TCE com ácido clorossulfónico, apresenta rendimentos mais baixos. Por sua vez o método do éster de TCE com ácido clorossulfónico, é realizado com recurso ao reagente que lhe dá o nome, sendo esse reagente demasiado caro. De entre os três métodos, o menos recomendado é o do ácido clorossulfónico, por ser muito reativo e realizar-se a temperaturas elevadas, o que pode causar degradação da molécula orgânica.

2 OBJETIVOS

A dieta mediterrânica vem ganhando relevância por vários estudos a relacionarem diretamente com a baixa incidência de doenças cardiovasculares, cancerígenas ou neurológicas nos povos que a praticam. Supõem-se que um dos elementos desta dieta responsável por tais efeitos será o azeite, que é a principal fonte de gordura utilizada e que na sua composição compreende compostos antioxidantes naturais, que teoricamente previnem ou anulam os danos oxidativos lipídicos causados por espécies reativas de oxigénio e azoto. Estudos *in vitro* comprovam que os compostos polifenólicos presentes no azeite apresentam uma atividade citoprotetora, contudo para que esta atividade seja efetiva *in vivo* é fundamental que estes compostos sejam biodisponíveis, sendo por isso necessário efetuar estudos acerca da sua biodisponibilidade.

Compostos polifenólicos como o hidroxitirosol estão atualmente bem relatados devido ao estímulo proporcionado aquando da descoberta da sua atividade antioxidante, porém, recentemente surgiu um artigo que relata que os compostos polifenólicos presentes em maior concentração na corrente sanguínea após ingestão de azeite são dois metabolitos do hidroxitirosol, o sulfato de acetato de hidroxitirosol e o sulfato de hidroxitirosol. Posto isto, entende-se ser de suma importância o estudo da biodisponibilidade destes dois metabolitos para melhor compreender a sua contribuição no efeito citoprotetor e hipotensor.

Não existindo bibliografia disponível abordando a temática da síntese de sulfatação de catecóis optou-se então numa primeira fase pelo estudo e optimização das condições reaccionais da dita sulfatação. Por questões logísticas, não se procedeu diretamente ao estudo no composto hidroxitirosol, recaindo a escolha no cafeato de metilo por este possuir na sua estrutura uma região catecólica semelhante à do hidroxitirosol.

Afinadas as condições iniciou-se a segunda parte do trabalho, que consistiu na sulfatação do hidroxitirosol e do seu respetivo acetato com o intuito de servirem de padrões identificativos para futuros estudos sobre a biodisponibilidade destes dois metabolitos.

3 MÉTODOS E PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS



3.1 MÉTODOS E REAGENTES

Os solventes e reagentes utilizados nas sínteses e work-out's eram Puros e nas colunas de cromatografia eram Para Análise (PA).

Como técnicas de análise para identificação dos compostos isolados ou sintetizados utilizaram-se a Cromatografia de Camada Fina (TLC), a Ressonância Magnética Nuclear de próton (^1H -RMN) e Espectroscopia de Massa (MS).

Efetou-se controlo das reações por TLC, com placas formadas por gel de sílica em suporte de alumínio (Merck 60S₂₅₄), e revelaram-se as placas por 3 métodos:

- No UV-Vis;
- Com iodo;
- Com solução de Mostain (100 mL de H_2SO_4 10%, 5,0 g de $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,22 g de $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$).

Traçaram-se os espectros de RMN num espectrofotómetro de 400 MHz (Bruker Avance III 400). As amostras eram diluídas em acetona, metanol ou DMSO deuterado.

Realizaram-se as análises de MS (Finnigan LCQ DECA XP MAX, equipado com fonte de API, recurso a sonda de ionização de electrospray (ESI) e fluxo de bomba de 3 $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$) com o capilar a 180°C e voltagem de 3V.

3.2 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

3.2.1 Síntese de hidroxitirosol (HyTy)

O hidroxitirosol foi sintetizado de acordo com o procedimento descrito por Baraldi *et al.*, 1983.

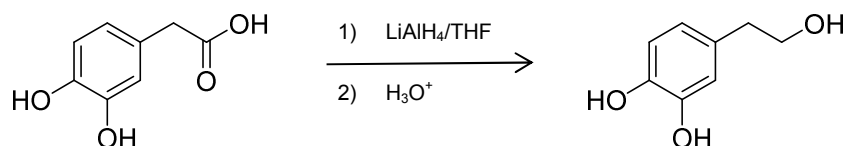


Figura 15- Síntese do Hidroxitirosol

Pesou-se para um balão de três tubuladoras tetrahidretoaluminato de lítio (LiAlH_4) (2,98 g; 78,5 mmol) e adicionou-se 35 mL de tetrahidrofurano (THF) anidro (Fig. 15). De seguida dissolveu-se ácido 3,4-dihidroxifenilacético (2,02 g; 12,01 mmol) em 65 mL THF

anidro e transferiu-se para uma ampola de adição. Colocou-se o balão em banho de gelo com agitação, montou-se a ampola de adição numa das tubuladoras e adicionou-se gota-a-gota a mistura da ampola à mistura que se encontrava no balão. Terminada a adição anterior colocou-se o balão em banho de óleo e deixou-se em refluxo durante 5 horas. Após o refluxo de 5 horas, colocou-se o balão em banho de gelo, mantendo a agitação, e adicionaram-se muito lentamente, mas com uma cadência regular, 50 mL de H₂O destilada fria, para destruir o excesso de LiAlH₄ existente e neutralizar o meio reaccional e logo de seguida da mesma maneira 70 mL de HCl 10%. Transferiu-se o conteúdo do balão para um funil de separação, e extraiu-se a fase aquosa com acetato de etilo (9 x 70 mL). Secaram-se as fases orgânicas com sulfato de magnésio anidro e evaporou-se o solvente.

Obteve-se um óleo de cor vermelha-acastanhada, que foi submetido a purificação por cromatografia em coluna, tendo como fase estacionária gel de sílica e como eluente acetato de etilo / éter de petróleo (40-60°C) (1:1). A purificação foi acompanhada por TLC ($R_{f \text{ HyTy}}=0,16$; $R_{f \text{ ác.3,4-dihidroxifenilacético}}=0,01$) utilizando o mesmo eluente que na coluna e revelando as placas por UV-Vís e em câmara de iodo. Obteve-se por fim 1,48g um composto oleoso com coloração amarelada identificado por TLC e ¹H-RMN como sendo o hidroxitirosol.

3.2.2 Síntese de acetato de hidroxitirosol

Sintetizou-se o acetato de hidroxitirosol de acordo com o método descrito por Bernini *et al.*, 2008.

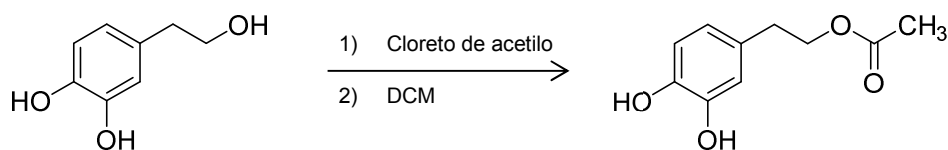


Figura 16- Síntese de acetato de hidroxitirosol

Num balão de fundo redondo e sob argón dissolveu-se hidroxitirosol (1,01 g; 6,55 mmol) em 25 mL de diclorometano (DCM) anidro (Fig. 16). Adicionando-se de seguida cloreto de acetilo (838 µL; 0,93 g; 11,8 mmol) e deixou-se em agitação à temperatura ambiente durante 24 horas. Alcançadas as 24 horas evaporou-se o solvente no evaporador rotativo e dissolveu-se o composto obtido (óleo esverdeado) em 25 mL de acetato de etilo. Transferiu-se o conteúdo do balão para um funil de separação e lavou-se com salmoura (2 x 30 mL). De seguida extraiu-se a fase aquosa anterior com acetato de etilo (2 x 30 mL). Juntaram-se todas as fases orgânicas obtidas nas lavagens e extracções e secaram-se com

sulfato de sódio anidro, evaporando no fim o solvente no evaporador rotativo. Obtiveram-se 0,940 g de um óleo amarelado.

Efetou-se a purificação do acetato de hidroxitirosol obtido na síntese por cromatografia em coluna. Como fase estacionária usou-se gel de sílica e como eluente DCM/metanol (35:2). A purificação foi acompanhada por TLC ($R_f=0,31$), usou-se o mesmo eluente utilizado na purificação por coluna, e revelaram-se as placas por UV-Vís e em câmara de iodo. Obtiveram-se 0,320 g de um óleo praticamente incolor identificado por TLC e $^1\text{H-RMN}$ como sendo o acetato de hidroxitirosol.

3.2.3 Síntese do cafeato de metilo

A síntese de cafeato de metilo é realizada em duas etapas, a primeira é a síntese de malonato de monometilo, e a segunda é a síntese de cafeato de metilo. Ambas as sínteses foram realizadas de acordo com o método descrito por Menezes *et al.*, 2011 (Fig. 17).

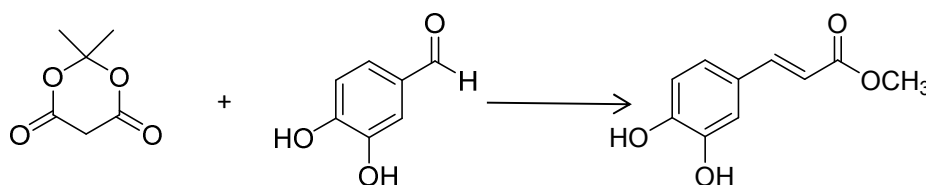


Figura 17- Síntese geral de cafeato de metilo

3.2.3.1 Síntese de malonato de monometilo

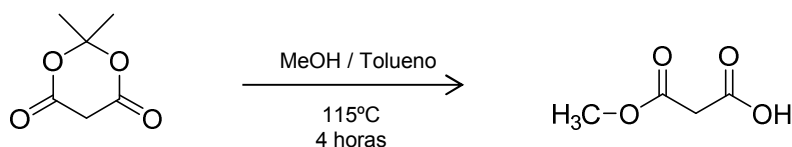


Figura 18- Síntese de malonato de monometilo

Num reator fechado juntaram-se ácido de Meldrum (ácido 2,2-dimetil-1,3-dioxano-4,6-diona) (2,88 g; 20 mmol), metanol (810 μL ; 0,641 g; 20 mmol) e 10 mL de tolueno e aqueceu-se durante 4 horas (Fig. 18). No final das 4 horas deixou-se arrefecer até à temperatura ambiente e adicionaram-se mais 10 mL de tolueno. De seguida transferiu-se a

mistura reaccional para um funil de separação e extraiu-se com solução saturada de bicarbonato de sódio (NaHCO_3) (3 x 30 mL). Após as extrações, neutralizaram-se as fases aquosas reunidas, com solução de ácido clorídrico (HCl) 1M até atingir pH~1, e extraiu-se com éter dietílico (3 x 30 mL). Juntaram-se as fases orgânicas, secaram-se com sulfato de sódio anidro e evaporou-se o solvente no evaporador rotativo, obtendo-se um sólido amarelado (1,09 g) identificado por ^1H -RMN como sendo o malonato de monometilo.

3.2.3.2 Síntese de cafeato de metilo

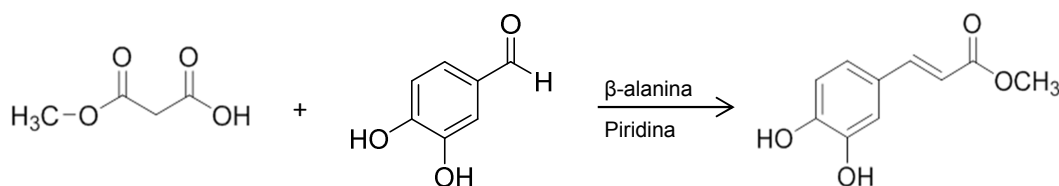


Figura 19- Síntese do cafeato de metilo

Num balão de fundo redondo pesaram-se malonato de monometilo (2,77 g; 23,5 mmol), 3,4-dihidroxibenzaldeído (3,25 g; 23,5 mmol), β -alanina (0,0987 g; 1,11 mmol) e adicionaram-se 5 mL de piridina (Py) (p.e._{Py}=115°C) (Fig. 19). Colocou-se o balão em aquecimento num banho de óleo a 40°C, com agitação, durante 24 horas. Ao fim das 24 horas aumentou-se a temperatura do banho para 60°C e deixou-se em agitação durante mais 24 horas. Após este período colocou-se o balão em banho de gelo. Neutralizou-se a mistura reaccional adicionando-se ao balão, mantido em gelo e com agitação, cuidadosamente gota-a-gota 5 mL de HCl concentrado (33%) arrefecido em gelo. Adicionaram-se 40 mL de H_2O destilada e transferir o conteúdo do balão para um funil de separação. Seguidamente realizaram-se extrações sucessivas com éter dietílico (8 x 40 mL), juntaram-se as porções da fase orgânica e lavaram-se com solução de NaHCO_3 0,6M (14 x 40 mL). Por fim secou-se a fase orgânica (éter dietílico) com sulfato de sódio anidro e evaporou-se o solvente no evaporador rotativo.

Obteve-se um sólido de cor amarelada (2 g), purificado posteriormente recorrendo à cromatografia em coluna. Utilizou-se como fase estacionária gel de sílica (0,040-0,063 mm; Merck) e como eluente éter de petróleo (40-60°C)/ acetato de etilo (1:1, v/v). Controlou-se a purificação por TLC utilizando o mesmo eluente utilizado na coluna cromatográfica, e a revelaram-se as placas por UV-Vís, em câmara de iodo e com solução de Moustain.

Após a evaporação do eluente obteve-se 1,20 g de um produto sólido de cor branca ligeiramente amarelada. Foi identificado por TLC ($R_f=0,48$) e ^1H -RMN como sendo o composto pretendido.

3.2.4 Síntese de sulfatação do cafeato de metilo

A síntese de sulfatação do cafeato de metilo foi realizada recorrendo a dois métodos, o método dos complexos de trióxido de enxofre e o método do ácido clorossulfónico.

3.2.4.1 Método dos complexos de trióxido de enxofre

Utilizamos dois reagentes diferentes para a síntese de sulfatos de cafeato de metilo pelo método dos complexos de trióxido de enxofre, o complexo trióxido de enxofre.Piridina ($\text{SO}_3\cdot\text{Py}$) e o complexo trióxido de enxofre.trietilamina ($\text{SO}_3\cdot\text{TEA}$).

3.2.4.1.1 Síntese efetuada com complexo trióxido de enxofre.piridina ($\text{SO}_3\cdot\text{Py}$) em piridina

Seguiu-se o método descrito por Learmonth *et al.*, 2002.

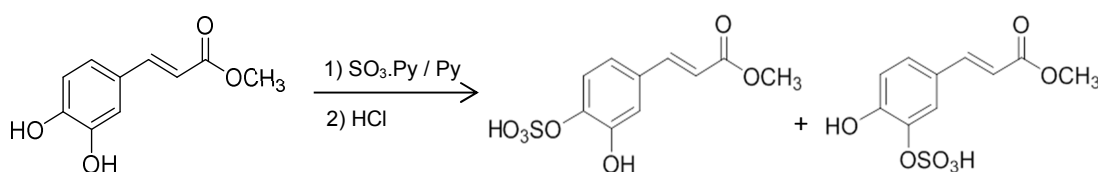


Figura 20- Síntese de sulfatação realizada com complexo $\text{SO}_3\cdot\text{Py}$ em Piridina

Num balão de fundo redondo adicionaram-se cafeato de metilo (0,50 g; 2,576 mmol), complexo $\text{SO}_3\cdot\text{Py}$ (1,23 g; 7,72 mmol) e 10mL de piridina e deixou-se em agitação à temperatura ambiente durante 24 horas (Fig. 20). No fim das 24 horas colocou-se o balão em banho de gelo, mantendo a agitação, e adicionaram-se 60 mL de HCl 2M gota-a-gota num processo que demorou cerca de 30 minutos. Transferiu-se o conteúdo do balão para um funil de separação e extraiu-se com éter dietílico (6 x 30 mL) e de seguida extraiu-se novamente com acetato de etilo (7 x 30 mL). Secaram-se as fases orgânicas

separadamente (fase do éter e do acetato) e evaporaram-se os solventes no evaporador rotativo.

Obtiveram-se a partir da fase etérea, 0,037 g de um composto sólido branco identificado por TLC como sendo cafeato de metilo ($R_f=0,48$; éter de petróleo (40-60°C)/acetato de etilo (1:1)), e 0,200 g a partir do extrato de acetato de etilo de um produto sólido branco amarelado, que foi posteriormente analisado por $^1\text{H-RMN}$.

A fase aquosa foi conservada a -20°C durante 48 horas, observando-se a formação de cristais. Filtraram-se os cristais por vácuo, lavaram-se com três pequenas porções de HCl 0,5M frio e de seguida também com três pequenas porções de éter dietílico frio. Purificaram-se os cristais por coluna cromatográfica, tendo como fase estacionária 20 g gel de sílica (usando como eluente acetato de etilo/metanol (9:1)). Após evaporação dos solventes analisaram-se os produtos obtidos por $^1\text{H-RMN}$.

3.2.4.1.2 Síntese realizada com complexo trióxido de enxofre.piridina ($\text{SO}_3\cdot\text{Py}$) em 1,4-dioxano

Seguiu-se o método descrito por Jones *et al.*, 2005, fazendo-se pequenas alterações.

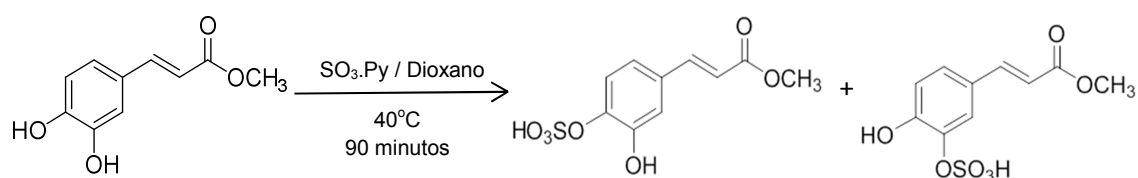


Figura 21- Síntese de sulfatação realizada com complexo $\text{SO}_3\cdot\text{Py}$ em 1,4-dioxano

Pesaram-se para um balão previamente saturado com argón, cafeato de metilo (0,50 g; 2,576 mmol), complexo $\text{SO}_3\cdot\text{Py}$ (2,46 g; 15,45 mmol) e dissolveram-se em 25 mL de 1,4-dioxano seco (Fig. 21). Colocou-se então o balão em aquecimento em banho de óleo durante 90 minutos a 40°C . Controlou-se a reação por TLC usando como eluente acetato de etilo/metanol (9:1) e revelando as placas no UV-Vís e em câmara de iodo. Após os 90 minutos, filtrou-se um sólido branco por cânula sob atmosfera de argon, e lavou-se com pequenas quantidades de éter dietílico frio o produto sólido branco obtido, aparentemente contendo uma mistura de dois compostos.

Efetou-se uma separação por cromatografia em coluna dos dois compostos

existentes no sólido obtido, usando como fase estacionária 200 g gel de sílica, e como eluente acetato de etilo/metanol (9:1). A purificação foi acompanhada por TLC, usando-se como eluente acetato de etilo/metanol (9:1). Combinaram-se os tubos contendo o primeiro composto a sair da coluna e adicionou-se 1,2 de trietilamina relativamente à quantidade de complexo de $\text{SO}_3\cdot\text{Py}$ usada no início da reação e evaporou-se o solvente no evaporador rotativo. Analisou-se o produto sólido obtido por ^1H -RMN.

Evaporou-se o dioxano e o éter das águas mães no evaporador rotativo e identificavam-se os produtos obtidos por ^1H -RMN.

Ainda houve uma tentativa de se protonar a mistura reacional logo depois de retirar do aquecimento, por adição de ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4) gota-a-gota; mas os resultados não foram positivos.

3.2.4.1.3 Síntese realizada com complexo trióxido de enxofre.trietilamina ($\text{SO}_3\cdot\text{TEA}$) em 1,4-dioxano

Procedimento igual ao anterior e também ao descrito por Jones *et al.*, 2005.

As quantidades utilizadas foram 0,20 g (1,03 mmol) de cafeato de monometilo, (1,12 g; 7,03 mmol) de complexo $\text{SO}_3\cdot\text{TEA}$ e 10 mL de *p*-dioxano. Deixou-se a mistura reacional em aquecimento durante 3,5 horas a 40°C e adicionaram-se então mais 0,568 g de complexo $\text{SO}_3\cdot\text{TEA}$ (0,568 g; 3,13 mmol), deixando mais 17 horas a 40°C .

O tratamento e purificação realizados foram iguais às do procedimento anterior.

3.2.4.1.4 Síntese realizada com ácido clorossulfónico em piridina

O método utilizado para a síntese de sulfatação do cafeato de metilo com ácido clorossulfónico-Py foi descrito por Hirano *et al.*, 1991, e divide-se em duas etapas.



3.2.4.1.4.1 Preparação do trióxido de enxofre.piridina

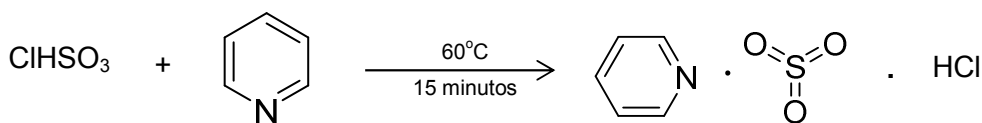


Figura 22- Síntese de preparação do trióxido de enxofre.piridina

Colocou-se num balão de fundo redondo piridina (1,93 mL, 1,89 g, 23,8 mmol) seca sob argón, de seguida colocou-se o balão em banho de gelo e adicionaram-se gota-a-gota, com muita precaução e agitação, ácido clorossulfónico (0,31 mL; 0,54 g; 4,66 mmol) ao balão (adição muito exotérmica e reativa). Aqueceu-se a mistura em banho de óleo a 60°C durante 15 minutos (Fig. 22).

3.2.4.1.4.2 Sulfatação do cafeato de metilo

Para um balão previamente saturado com árgon pesaram-se cafeato de metilo (0,50 g; 2,58 mmol) e dissolveram/dispersaram-se em 0,7 mL de piridina seca. De seguida transferiu-se a mistura deste balão para o balão que havia sido preparado anteriormente com o ácido clorossulfónico-Py e aqueceu-se a mistura em banho de óleo a 70°C durante 30 minutos com agitação. Ao fim de 30 minutos colocou-se o balão reaccional em banho de gelo, mantendo-se a agitação, e adicionaram-se gota-a-gota 25 mL de HCl 2M (controlando o pH com papel indicador até se obter pH~1). Transferiu-se o conteúdo do balão para um funil de separação e extraiu-se a fase aquosa com acetato de etilo (6 x 15 mL), secaram-se as fases orgânicas com sulfato de sódio anidro e evaporou-se o solvente no evaporador rotativo. Analisou-se o produto obtido por ¹H-RMN.

3.5.2 Síntese de sulfatação do acetato de hidroxitirosol

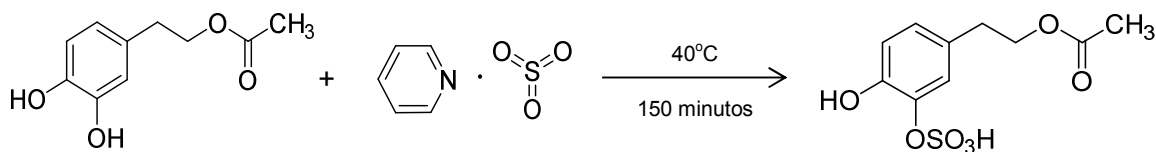


Figura 23- Síntese de sulfatação de acetato de hidroxitirosol

Para um balão de fundo redondo pesaram-se acetato de hidroxitirosol (0,30 g; 1,55 mmol) e complexo $\text{SO}_3\cdot\text{Py}$ (1,35 g; 8,50 mmol), e dissolveram-se em 8 mL de *p*-dioxano. Aqueceu-se durante 150 minutos a 60°C, com agitação (Fig. 23). No fim do tempo de reação, adicionou-se 1,2 equivalentes de dietilamina (DEA) relativamente à quantidade de complexo $\text{SO}_3\cdot\text{Py}$ inicial, e filtrou-se o produto por cânula e lavou-se com éter dietílico frio. Analisou-se o produto oleoso obtido por ^1H -RMN.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 SÍNTESE DE COMPOSTOS POLIFENÓLICOS

4.1.1 Síntese de hidroxitirosol

O hidroxitirosol foi sintetizado segundo o método descrito por Baraldi *et al.*, 1983 (Fig. 24).

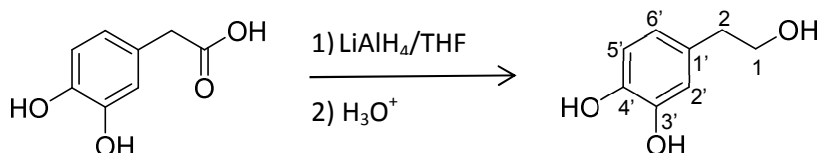


Figura 24- Síntese do Hidroxitirosol

Obtiveram-se 1,48 g de composto puro, com aspeto oleoso e praticamente transparente, com um rendimento de 81%.

¹H-RMN (CD₃OD, 400 MHz): δ 6,71 (d, J=8 Hz, 1H, H-5'), δ 6,69 (d, J=2 Hz, 1H, H-2'), δ 6,55 (dd, J=2 Hz e J=6 Hz, 1H, H-6'), δ 3,70 (t, J=7,2 Hz, 2H, H-2), δ 2,68 (t, J=7,2 Hz, 2H, H-1).

4.1.2 Síntese de acetato de hidroxitirosol

O acetato de hidroxitirosol foi sintetizado segundo o método descrito por Bernini *et al.*, 2008 (Fig. 25). O composto foi obtido a partir da reação química entre o hidroxitirosol e o cloreto de acetilo, que reagiram à temperatura ambiente e durante 24 horas, com agitação. O composto obtido foi identificado por TLC ($R_f=0,38$; DCM/metanol (35:2)) e ¹H-RMN como sendo o acetato de hidroxitirosol.



Figura 25- Síntese de acetato de hidroxitirosol

Obtiveram-se 0,32 g de composto puro, com aspeto oleoso e amarelada, o que corresponde a um rendimento de 25%. Este rendimento está em linha com rendimentos obtidos para a mesma reação (Bernini *et al.*, 2008).

¹H-RMN (CD₃OD): δ 6,70 (d, J=8 Hz, 1H, H-5'), δ 6,67 (d, J=2 Hz, 1H, H-2'), δ 6,55 (dd, J=2 Hz e J=6 Hz, 1H, H-6'), δ 4,20 (t, J=6,8 Hz, 2H, H-3), δ 2,78 (t, J=7,2 Hz, 2H, H-4), δ 2,02 (s, 3H, H-1).

4.1.3 Síntese de cafeato de metilo

Como já referido anteriormente, a síntese do cafeato de metilo é dividida em duas etapas, a da síntese do malonato de monometilo, e a da síntese de cafeato de metilo. Ambas as sínteses foram realizadas de acordo com o procedimento descrito por Menezes *et al.*, 2011.

4.1.3.1 Síntese do malonato de monometilo

O malonato de monometilo foi sintetizado a partir da reação química entre o ácido de Meldrum e o metanol (Fig. 26) obtendo-se cristais brancos ($\eta=90\%$). A reação já estava bem estudada, daí não se ter realizado análise de ¹H-RMN tendo-se efetuado apenas uma análise por TLC ($R_f=[0,0-2,9]$, éter de petróleo (40-60°C)/ acetato de etilo (1:1)).

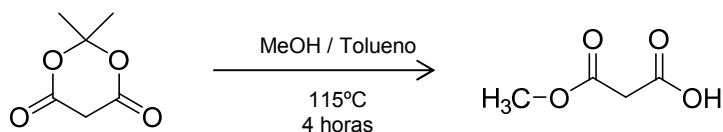


Figura 26- Síntese de malonato de monometilo

4.1.3.2 Síntese de cafeato de metilo

Para se sintetizar o cafeato de metilo fez-se reagir o malonato de monometilo, previamente sintetizado, com 3,4-dihidroxibenzaldeído durante 24 horas (Fig.27), a uma

temperatura de 40°C. Verificou-se ao fim deste tempo a existência de uma grande quantidade de reagente inicial, pelo que se decidiu aumentar a temperatura da reação, para 60°C de modo a acelerar o processo.

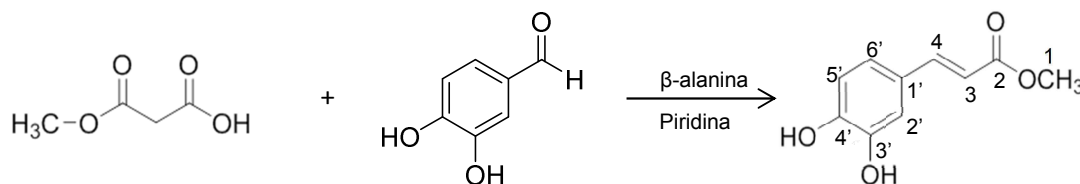


Figura 27– Síntese de cafeato de metilo

Obteve-se, após purificação por coluna cromatográfica, um composto sólido branco identificado por TLC [$R_f=0,48$; éter de petróleo (40-60°C)/ acetato de etilo (1:1)] , ^1H -RMN e espectroscopia de massa (Fig. 28 e 29, Tabela 3) como sendo o composto desejado.

O rendimento obtido ($\eta=72\%$) foi mais baixo do que o esperado, não havendo comparação direta com cafeato de metilo, mas por comparação com outros cafeato de cadeia alquila mais longa (Menezes *et al.*, 2008).

^1H -RMN (CD_3OD , 400 MHz): δ 7,56 (d, $J=16$, 1H, H-4), δ 7,05 (d, $J=2$, 1H, H-2'), δ 6,96 (dd, $J=2$ e $J=8$, 1H, H-6'), δ 6,79 (d, $J=8,4$, 1H, H-5'), δ 6,27 (d, $J=16$, 1H, H-3), δ 3,77 (s, 3H, H-1).

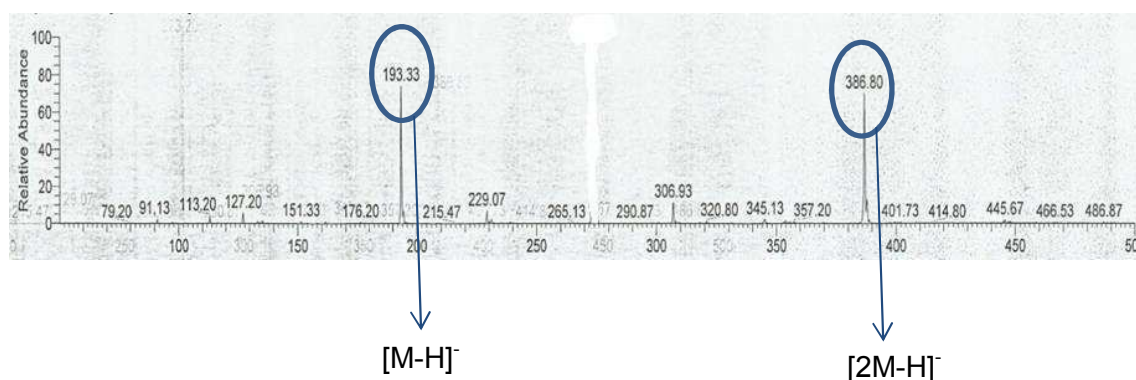


Figura 28- Espectro de massa do cafeato de metilo em modo negativo

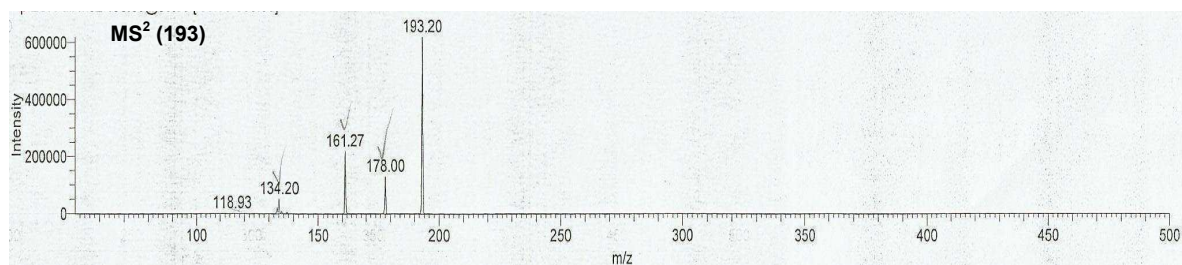
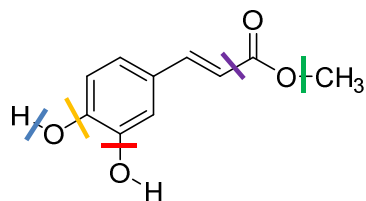


Figura 29- Espetro de massa do ião ($m/z=193$) em modo negativo

Tabela 3- Interpretação do espetro de massa do ião ($m/z=193$) em modo negativo

Fragmento	m/z
$[M-H]^-$	193
$[M-H-CH_3]^-$	178
$[M-H-CH_3-OH]^-$	161
$[M-H-CH_3-CO_2]^-$	134
$[M-H-CH_3-CO_2-O]^-$	118

4.2 SÍNTESE DE SULFATAÇÃO DE COMPOSTOS POLIFENÓLICOS

4.2.1 Sulfatação do cafeato de metilo

4.2.1.1 Síntese utilizando complexos de trióxido de enxofre

4.2.1.1.1 Síntese efetuada com complexo trióxido de enxofre.piridina (SO₃.Py) em piridina

Para realizar a síntese de sulfatação utilizando o complexo de SO₃.Py em piridina, utilizou-se o método descrito por Learmonth *et al.*, 2002 (Fig.30).

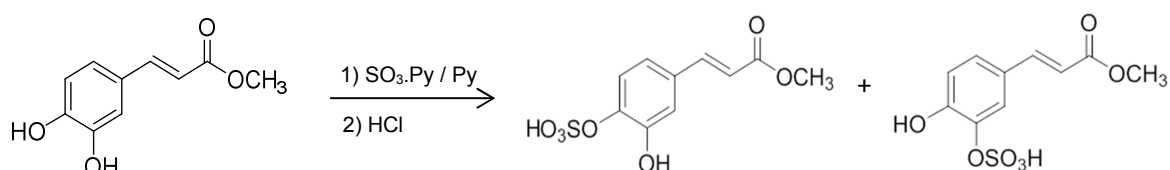


Figura 30- Síntese de sulfatação realizada com complexo SO₃.Py em Piridina

Após o tempo de reação, adicionou-se HCl diluído e extraiu-se a mistura reacional com éter dietílico e com acetato de etilo na tentativa de extrair o sulfato. Verificou-se por TLC [acetato de etilo/ metanol (9:1)] que se conseguia extrair apenas cafeato de metilo com o éter dietílico (massa ~ 37 mg), e pelo menos 3 compostos com o acetato de etilo (Fig. 31), um com $R_f \sim 0$ correspondente ao cloreto de piridina, outro $R_f = 0,48$ correspondente ao cafeato de metilo e outro com um intervalo de R_f de [0,12-0,28] que poderia corresponder ao sulfato pretendido. Analisou-se o sólido obtido na evaporação do acetato de etilo (massa ~ 200 mg) por ¹H-RMN verificando-se a presença de 4 compostos: cloreto de piridina, cafeato de metilo e duas moléculas bastante semelhantes, correspondentes provavelmente aos sais de piridina de sulfato 3'-O e do sulfato 4'-O do cafeato de metilo. De acordo com o espectro (Tabela 4), os sais de piridina de 3'-O-sulfato e de 4'-O-sulfato e o cafeato de metilo encontravam-se na proporção de 1,00:0,51:0,41, respetivamente (Fig. 32).

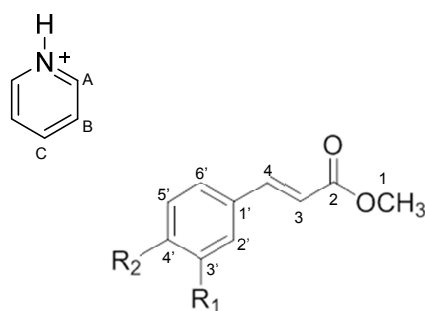


Figura 31 - Estrutura dos metabolitos sulfatados do cafeato de metilo

Nº do composto	R ₁	R ₂	Nome do composto
1	OH	OH	Cafeato de metilo
2 ^a	OH	OSO ₃ ⁻	4'-O-Sulfato
2 ^b	OSO ₃ ⁻	OH	3'-O-Sulfato

Tabela 4 – Caraterização espectroscópica por ^1H -RMN do produto extraído com acetato de etilo após a sulfatação do cafeato de metilo efetuada com complexo trióxido de enxofre.piridina ($\text{SO}_3\cdot\text{Py}$) em piridina

Nº de ^1H	Compostos								
	1			2a			2b		
	δ (ppm)	sinal	J (Hz)	δ (ppm)	Sinal	J (Hz)	δ (ppm)	sinal	J (Hz)
1	3,77(5)	s	-	3,79	s	-	3,77(8)	s	-
3	6,28	d	16,0	6,42	d	16,0	6,37	d	16,0
6'	6,96	dd	2,0 e 8,4	7,07	dd	2,0 e 8,4	7,29	dd	2,0 e 8,4
5'	6,79	d	8,0	7,36	d	8,4	6,91	d	8,4
2'	7,05	d	2,4	7,14	d	2,4	7,60(5)	d	2,4
4	7,56	d	15,6	7,59(6)	d	15,6	7,59(6)	d	15,6
A	-	-	-	8,85	dd	5,2	8,85	dd	5,2
B	-	-	-	8,06	dt	1,2 e 6,4	8,06	dt	1,2 e 6,4
C	-	-	-	8,60	tt	1,6 e 8,0	8,60	tt	1,6 e 8,0

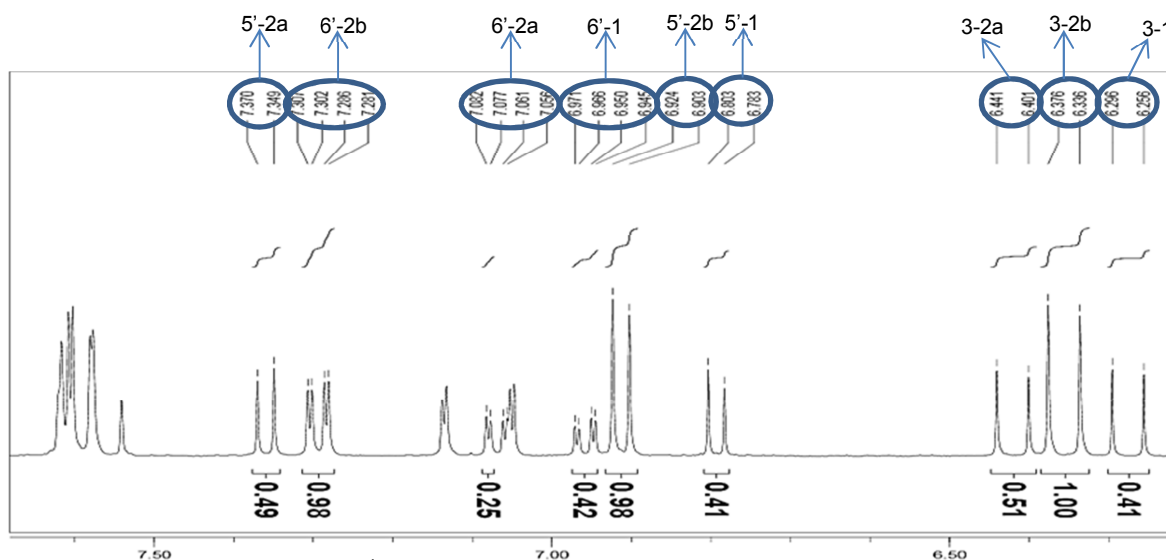


Figura 32- Intervalo do espectro de ^1H -RMN da fase de acetato de etilo da sulfatação do cafeato de metilo realizada com complexo $\text{SO}_3\cdot\text{Py}$ em piridina onde é visível a integração dos H-6', H-5' e H-3 dos vários compostos presentes

A fase aquosa foi colocada no congelador ocorrendo precipitação. Filtrou-se o precipitado por vácuo e por análise de TLC dos cristais obtidos, verificou-se novamente a existência de pelo menos 3 compostos. Analizaram-se os cristais por ^1H -RMN verificando-se a presença de cloreto de piridina, cafeato de metilo e sais de piridina de sulfato 3'-O e sulfato 4'-O do cafeato de metilo. De acordo com o espectro obtido, os sais de piridina do 3'-O-sulfato, os sais de piridina do 4'-O-sulfato e o cafeato de metilo encontravam-se nas proporções de 0,78:0,50:1,00 respetivamente (Fig. 33).

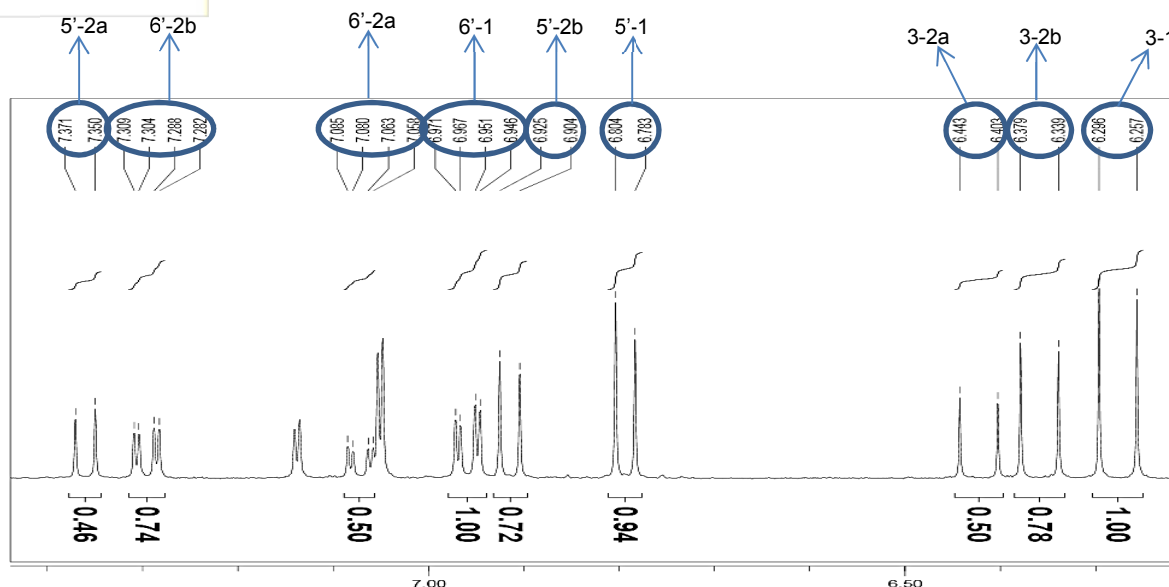


Figura 33- Intervalo do espectro de ¹H-RMN dos cristais resultantes da precipitação da fase aquosa da sulfatação do cafeato de metilo realizada com complexo SO₃.Py em piridina onde é indicada a integração dos H-3, H-5' e H-6' dos vários compostos presentes

Depois da filtração dos cristais, procedeu-se à separação por coluna ($m_{\text{silica}}=20\text{g}$) das várias fracções observadas no TLC, recolheram-se as fracções correspondentes ao $R_f=0,22$ [acetato de etilo/ metanol (9:1)] tendo-se um sólido que se caracterizou por ¹H-RMN e identificando-se 3 compostos, 3'-O-sulfato, o 4'-O-sulfato e o cafeato de metilo nas proporções de 1,00:0,33:0,27 (Fig. 34). A purificação permitiu eliminar o cloreto de piridina, mas não se conseguiu obter os cafeatos de metilo sulfatados isolados.

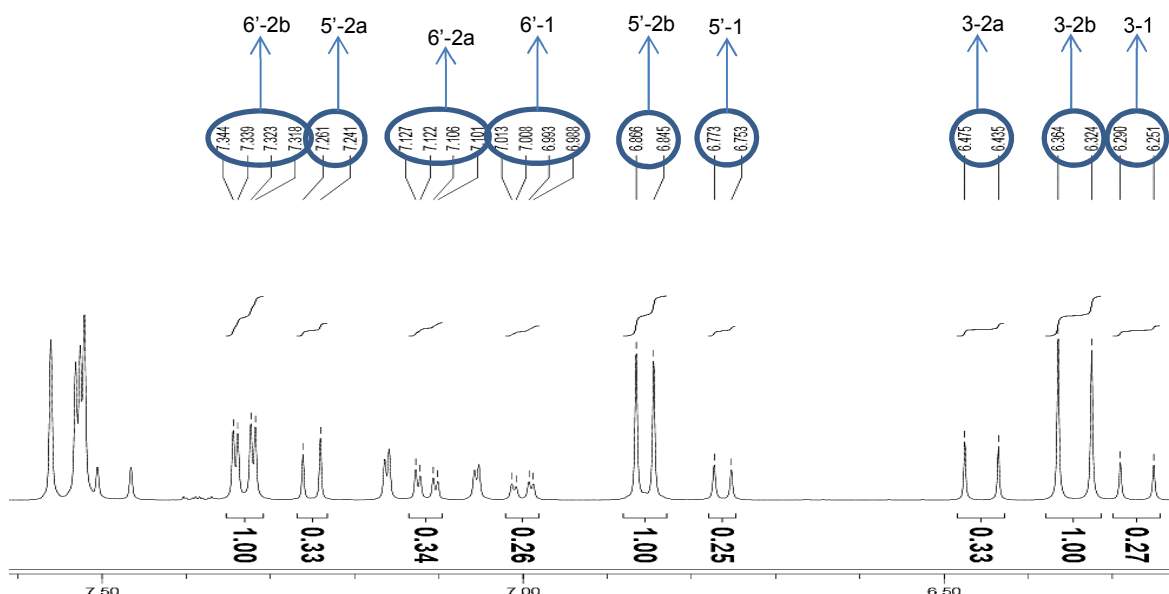


Figura 34- Intervalo do espectro de ¹H-RMN do produto obtido após separação por cc onde é indicada a integração dos H-3, H-5' e H-6' dos vários compostos presentes

Assim, durante a síntese dos sulfatos parece existir uma preferência pela sulfatação do hidroxilo posicionado em *meta*. De fato, observando as estruturas de ressonância do cafeato de metilo, verifica-se que os eletrões não ligantes do oxigénio do grupo hidroxilo na posição *para* (Fig. 35) poderão deslocar-se por um maior número de átomos do que os electrões do grupo hidroxilo posicionado em *meta* (Fig. 36), o que confere ao oxigénio em *meta* maior carater nucleofílico.

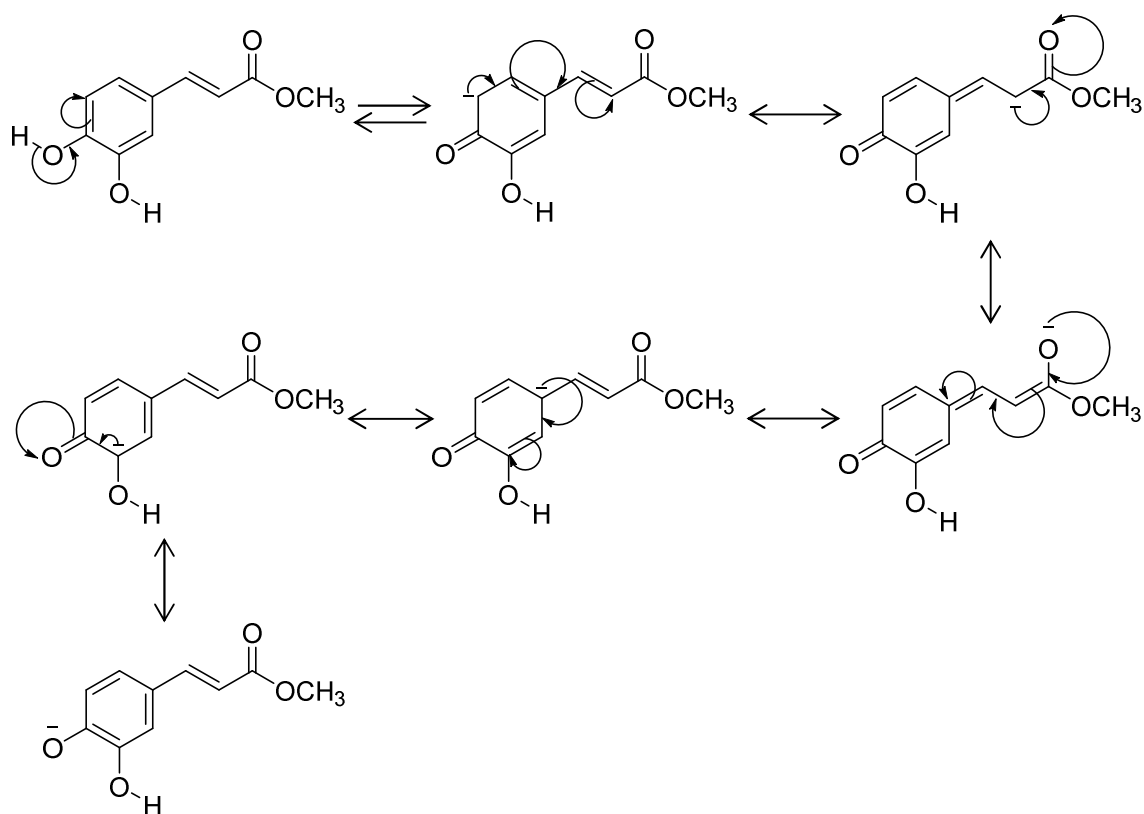


Figura 35- Estruturas de ressonância em posição *para*

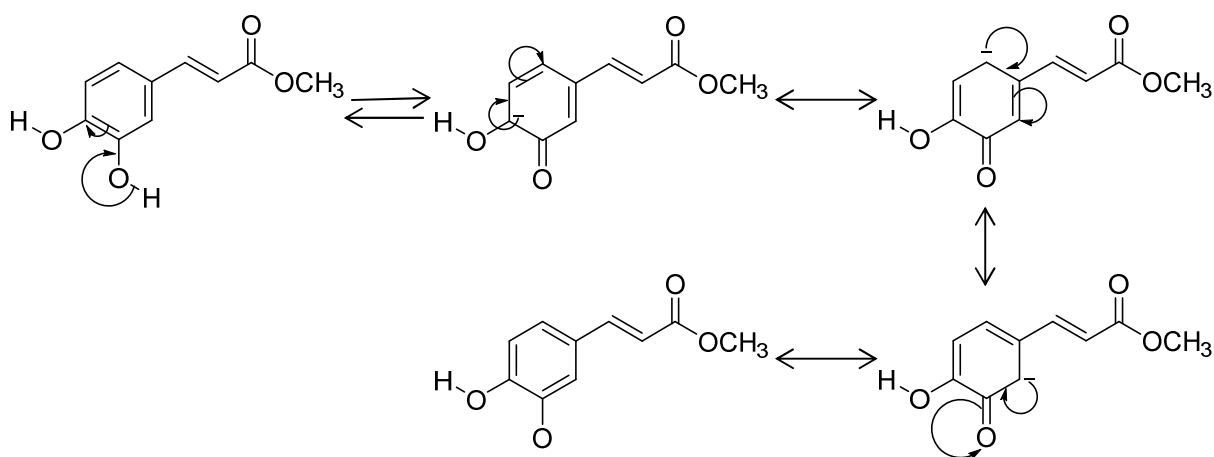


Figura 36- Estruturas de ressonância em posição *meta*

A partir da análise do espectro de massa obtido para a mistura final, confirma-se a existência de apenas monossulfatos de cafeato de metilo na mistura (Fig. 37 e 38, Tabelas 5 e 6), uma vez que apenas se observa um pico molecular de $m/z=273$ correspondente a monossulfato de cafeato de metilo.

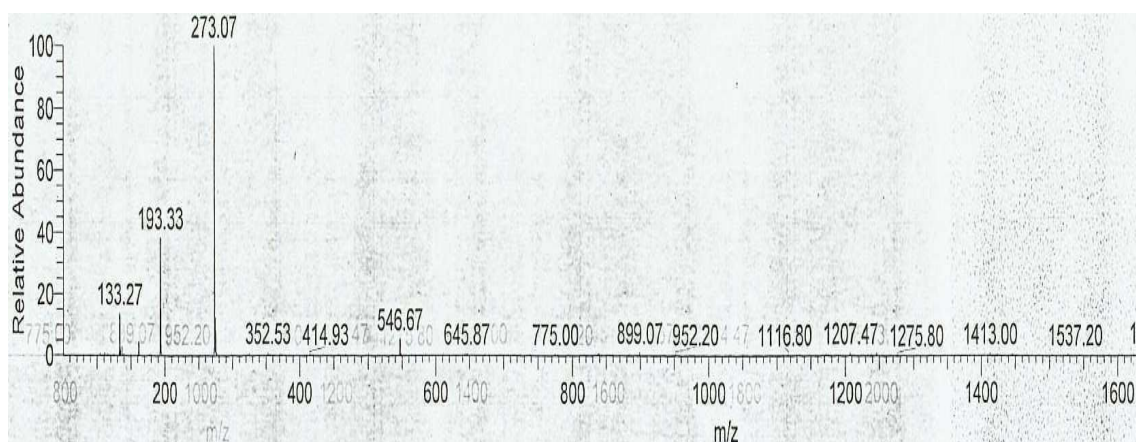
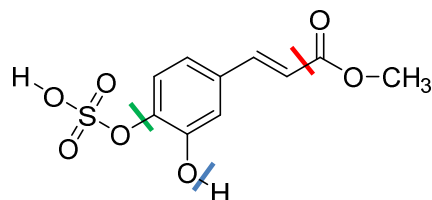


Figura 37- Espectro de massa do sólido obtido na síntese de sulfatação do cafeato de metilo realizada com complexo de $\text{SO}_3\cdot\text{Py}$ em piridina

Tabela 5- Interpretação do espectro de massa do sulfato do cafeato de metilo (Fig. 37)

Fragmento	m/z
$[\text{M}-\text{H}]^-$	273
$[\text{M}-\text{SO}_3\text{H}]^-$	193
$[\text{M}-\text{H}-\text{SO}_3\text{H}-\text{CO}_2-\text{CH}_3]^-$	133

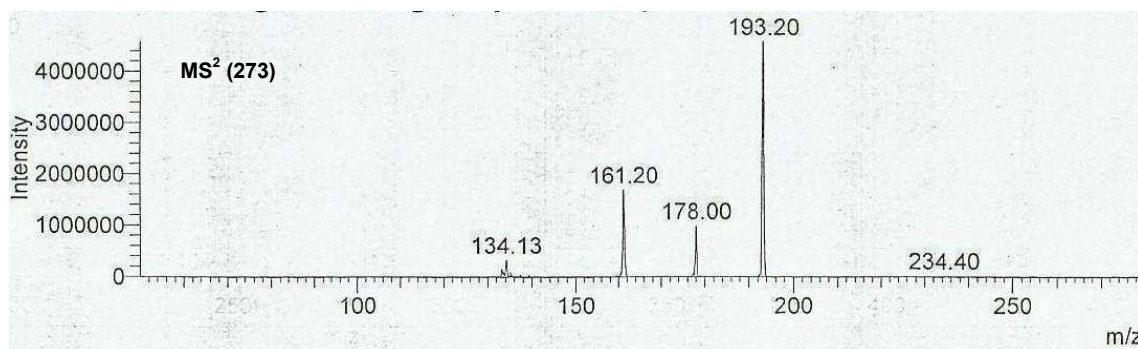
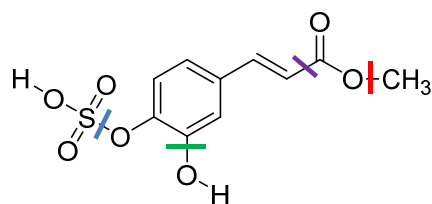


Figura 38- Espectro de massa do ião ($m/z=273$) em modo negativo

Tabela 6- Interpretação do espectro de massa do ião ($m/z=273$) em modo negativo (Fig. 38)

Fragmentos	m/z
$[M-SO_3H]^-$	193
$[M-SO_3H-CH_3]^-$	178
$[M-SO_3H-CH_3-OH]^-$	161
$[M-SO_3H-CH_3-CO_2]^-$	134

4.2.1.1.2 Síntese efetuada com complexo trióxido de enxofre.piridina ($SO_3.Py$) em 1,4-dioxano

Utilizou-se o método descrito por Jones *et al.*, 2005, para realizar a síntese de sulfatação onde é usado complexo de $SO_3.Py$ em 1,4-dioxano, como representado na figura 39.

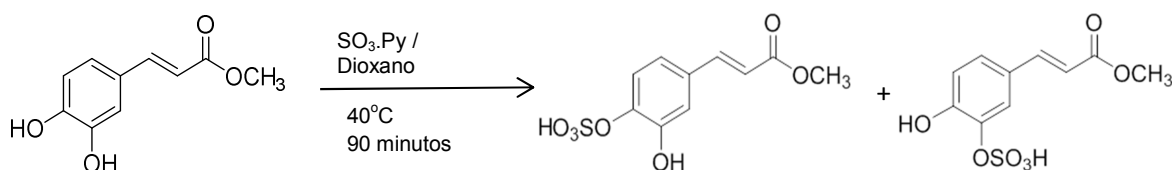


Figura 39- Síntese de sulfatação realizada com complexo $SO_3.Py$ em 1,4-dioxano

Após a filtração da suspensão reaccional, realizaram-se lavagens com éter dietílico e evaporou-se o solvente. Confirmou-se por TLC [$R_f=0,48$; éter de petróleo (40-60°C)/ acetato de etilo (1:1)] e ^1H -RMN que o único composto existente no éter dietílico era o cafeato de metilo.

Por análise do espectro de ^1H -RMN, do produto sólido obtido, verificou-se a existência do cafeato de metilo, de sais de piridina do cafeato de metilo sulfatado (3'-O-sulfato e 4'-O-sulfato) e de outros sais de piridina. A proporção obtida entre o 3'-O-sulfato do cafeato de metilo, o 4'-O-sulfato do cafeato de metilo e o cafeato de metilo foi de 0,46:0,25:1,00, respectivamente (Fig. 40). Uma vez que após a finalização da reação não se observou no TLC a presença de cafeato de metilo, pelo menos numa quantidade tão elevada como aquela que se observou por ^1H -RMN, concluiu-se que durante a purificação os sulfatos deveriam sofrer decomposição.

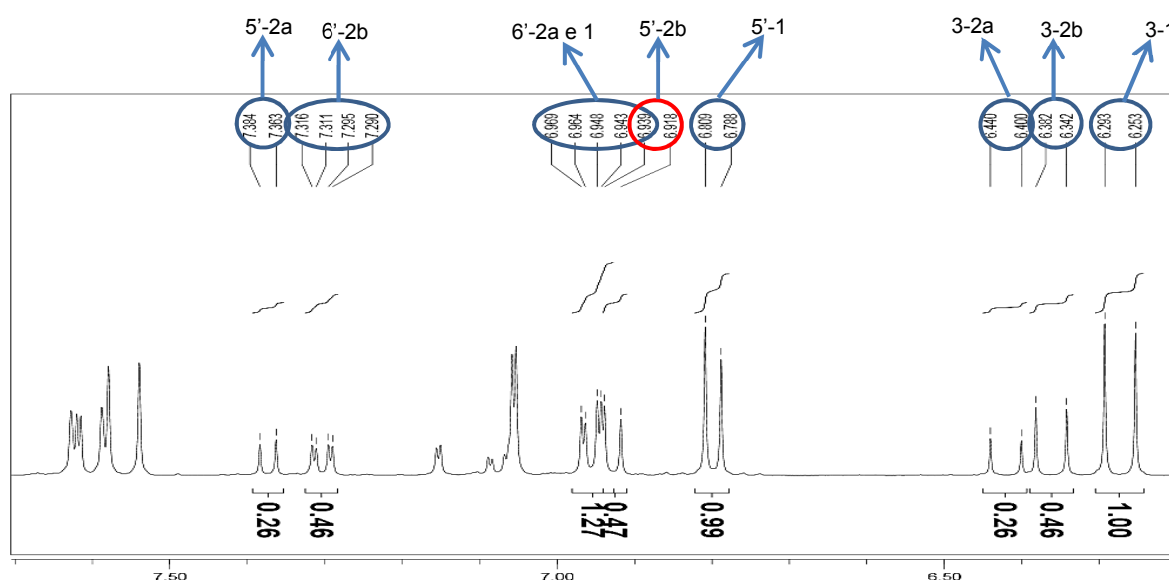


Figura 40- Intervalo do espectro de ^1H -RMN do sólido obtido da sulfatação do cafeato de metilo realizada com complexo $\text{SO}_3\cdot\text{Py}$ em 1,4-dioxano onde é indicada a integração dos H-3 e H-6' dos vários compostos presentes

De acordo com a bibliografia consultada (Bamford *et al.*, 1975) a decomposição dos monosulfatos pode ocorrer por dois mecanismos:

- A $\text{pH} < 4$ ocorre uma decomposição catalisada por ácido muito rápida
- Entre $\text{pH} 4$ -10 ocorre igualmente uma decomposição espontânea rápida na presença de excelentes grupos de saída.

Verificou-se que quando os sulfatos se encontram na presença de pequenas quantidades de água, como por exemplo numa mistura de 1,9% de H₂O-Dioxano, existe um deslocamento do equilíbrio da reação no sentido da decomposição do sulfato maior do que na presença apenas de água. A decomposição pode chegar a atingir velocidades 10⁷ mais elevadas na presença de pouca água relativamente àquela que se observa na presença de muita água. O mecanismo proposto (Bamford *et al.*, 1975) (Fig.41) para a hidrólise dos sulfatos envolve a cisão da ligação S-O por um mecanismo unimolecular, com eliminação de SO₃.

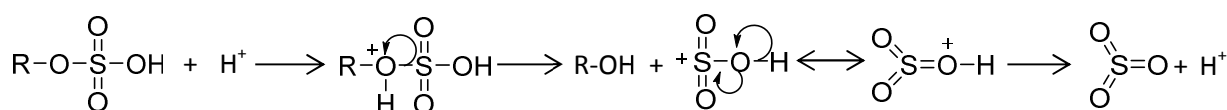


Figura 41- Mecanismo de degradação dos monosulfatos

Esta decomposição espontânea ocorre ainda em maior extensão quando o anel aromático possui substituintes fortemente retiradores de electrões, como é o caso do cafeato de metilo.

Assim, de modo a evitar a hidrólise durante os vários passos da purificação alteraram-se alguns passos.

- Passou-se a fazer a filtração por cânula sob atmosfera de árgon em vez da filtração por vácuo;
- Utilizou-se uma massa de gel de sílica menor para proceder à purificação por coluna cromatográfica;
- Adicionaram-se 1,1 equivalentes de trietilamina (TEA), relativamente ao complexo de SO₃.Py utilizado, às frações obtidas por cc contendo os sulfatos antes de efetuar a evaporação do solvente. Com estes procedimentos tentou-se estabilizar os sulfatos, já que a constante de basicidade da TEA é 10⁵ mais elevada que a da Py.

Após a purificação por cc obtiveram-se 18,8 mg de uma mistura que quando analisada por ¹H-RMN mostrou conter apenas os sais de TEA de 3'-O-sulfato e 4'-O-sulfato de cafeato de metilo e um pouco de cafeato de metilo na proporção de 1,00:0,82:0,07, respectivamente (Fig.42, Tabela 7). Os sais de piridina foram totalmente removidos

Devido ao baixo rendimento obtido, e supondo que este fosse causado pelo fato de

só ser possível separar por cc a fração de sulfatos neutralizados, tentou-se neutralizar a mistura no final da reação com um ácido. A adição do ácido mostrou-se igualmente problemática uma vez que nunca foi possível separar posteriormente o ácido adicionado dos sulfatos obtidos. Tentou-se inicialmente a utilização de um ácido orgânico, o ácido fórmico, e posteriormente um ácido inorgânico, ácido sulfúrico concentrado, com iguais resultados.

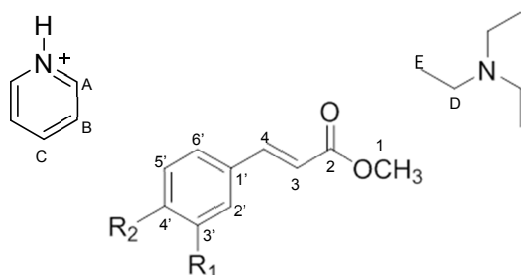


Figura 31 - Estrutura dos metabolitos sulfatados do cafeato de metilo

Nº do composto	R ₁	R ₂	Nome do composto
1	OH	OH	Cafeato de metilo
2a	OH	OSO ₃ ⁻	4'O-Sulfato
2b	OSO ₃ ⁻	OH	3'O-Sulfato

Tabela 7- Caraterização espectroscópica por ¹H-RMN dos sais de TEA

Nº de ¹ H	Compostos								
	1			2a			2b		
	δ (ppm)	sinal	J (Hz)	δ (ppm)	sinal	J (Hz)	δ (ppm)	sinal	J (Hz)
D	-	-	-	3,01	q	7,2	3,01	q	7,2
E	-	-	-	1,26	t	7,2	1,26	t	7,2

Nota: os desvios químicos dos vários compostos presentes na amostra encontram-se na página 43.

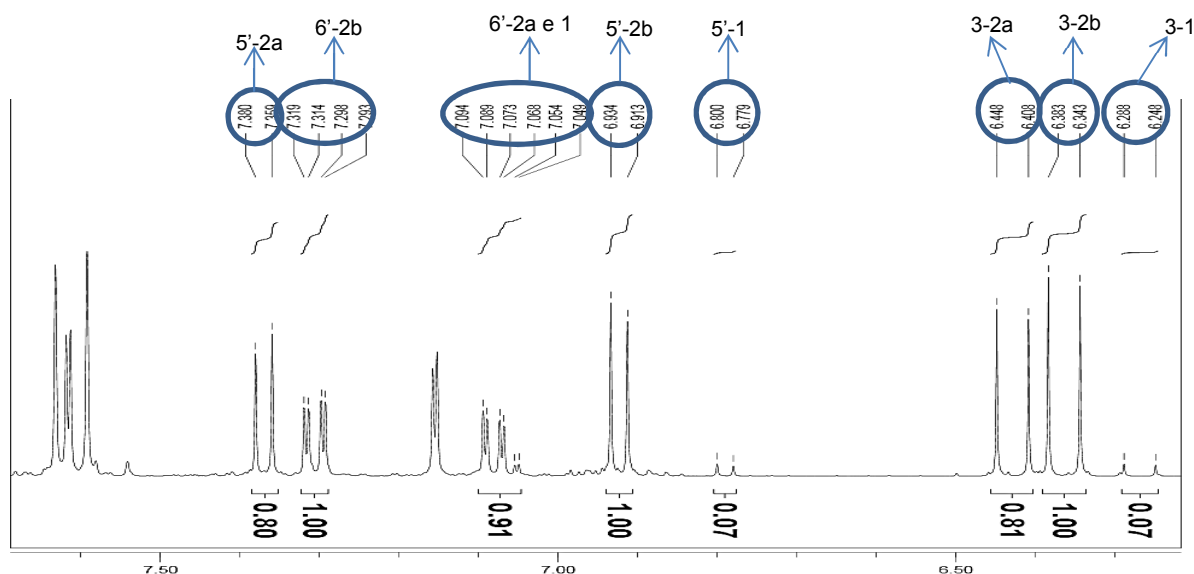


Figura 42- Intervalo do espectro de ¹H-RMN do sólido obtido da sulfatação do cafeato de metilo realizada com complexo SO₃.Py em 1,4-dioxano após purificação por cc, onde é indicada a integração dos H-3, H-6' e H-5' dos vários compostos presentes

4.2.1.1.3 Síntese efetuada com complexo trióxido de enxofre.trietilamina (SO₃.TEA) em 1,4-dioxano

Utilizou-se o método descrito por Jones *et al.*, 2005, para realizar a síntese de sulfatação pelo método do complexo de SO₃.TEA em *p*-dioxano, como representa a (Fig. 43).

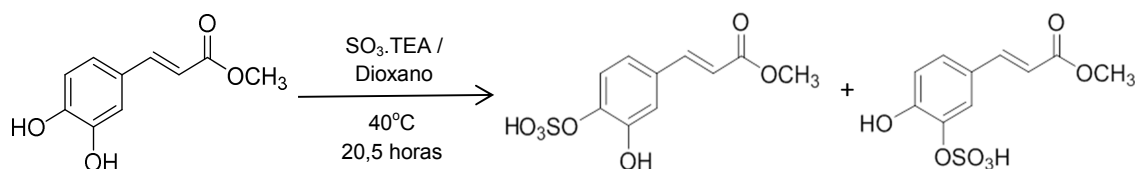


Figura 43- Síntese de sulfatação realizada com complexo de SO₃.TEA em 1,4-dioxano

Realizou-se a síntese utilizando este complexo numa tentativa de no final da reação conseguirmos obter o composto sulfatado sem complexo inicial, uma vez que utilizando SO₃.Py existiam sempre sais de piridina e complexo na mistura reacional final. Como a trietilamina tem um ponto de ebulição muito mais baixo (p.e = 89,7°C) que a piridina (p.e = 115,2°C), utilizou-se então o complexo de SO₃.TEA, com o objetivo de tornar mais fácil eliminar qualquer excesso de complexo por evaporação da trietilamina e do trióxido de enxofre na etapa da evaporação do solvente após a purificação cromatográfica.

O procedimento para esta reação foi em tudo semelhante ao anterior, tendo sido feitas ligeiras alterações ao tempo de reação e à quantidade de complexo de trióxido de enxofre utilizada. No entanto, mesmo ao fim de 20,5 horas, não se verificou, por TLC, o consumo de reagente inicial nem o aparecimento de forma significativa de uma mancha correspondente à formação de sulfatos.

O espetro de ¹H-RMN do composto sólido obtido após a filtração da mistura reacional, confirma a inexistência de cafeato de metilo ou seus metabolitos. Assim, não ocorreu qualquer reação e todo cafeato de metilo foi removido da mistura reacional durante as lavagens com o éter dietílico.

A reatividade dos complexos de trióxido de enxofre (SO₃) é inversamente proporcional à sua estabilidade, que por sua vez varia diretamente de acordo com a força da base usada no complexo. Ora como a trietilamina, comparativamente com a piridina, é uma base muito mais forte, torna o complexo de SO₃ mais estável e consequentemente menos reativo.

4.2.1.1.4 Síntese de sulfatação do cafeato de metilo efetuada com ácido clorossulfónico em piridina

Para aplicação deste método utilizou-se o procedimento descrito por Hirano *et al.*, 1991.

Após o término da síntese, fizeram-se extrações com acetato de etilo; fez-se TLC e identificou-se o composto presente nesta fase como cafeato de metilo [$R_f=0,48$; éter de petróleo (40-60°C)/ acetato de etilo (1:1)]. O produto obtido da reação foi identificado por ^1H -RMN como tendo na sua composição sais de piridina dos sulfatos do cafeato de metilo. Os sais de piridina do 3'O-sulfato do cafeato de metilo encontravam-se numa proporção de 1,00:0,63:0,46 em relação ao cafeato de metilo e aos sais de piridina do 4'O-sulfato do cafeato de metilo respectivamente (Fig. 44). Estas proporções são explicadas em função do descrito na síntese de sulfatação do cafeato de metilo com complexo de $\text{SO}_3\cdot\text{Py}$ em piridina.

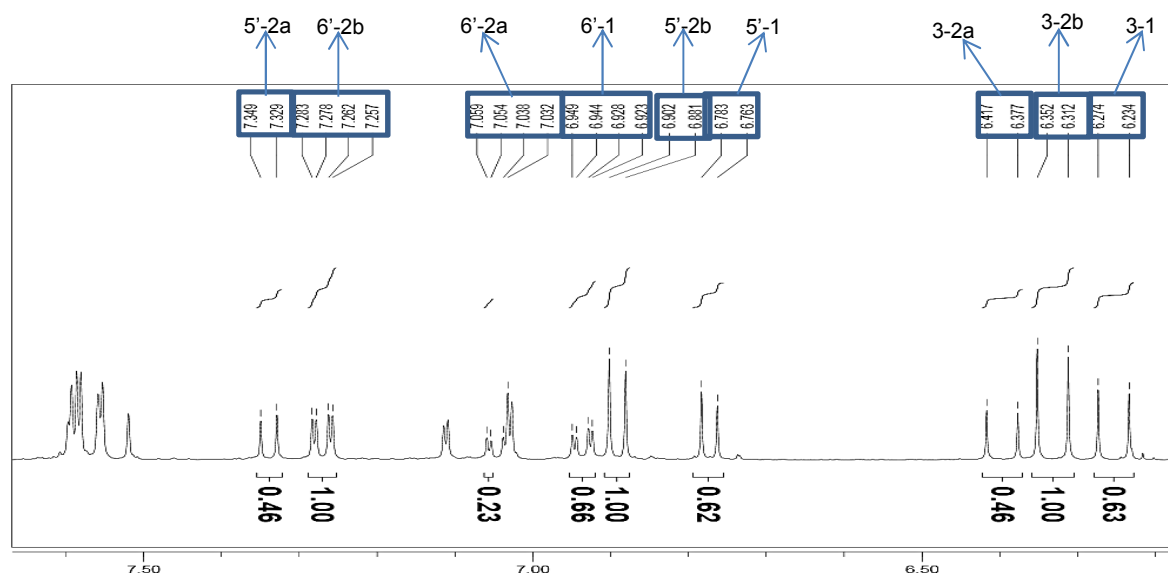


Figura 44- Intervalo do espectro de ^1H -RMN do sólido obtido da sulfatação do cafeato de metilo realizada com ácido clorossulfónico em piridina, onde é indicada a integração dos H-3, H-6' e H-5' dos vários compostos presentes

4.2.1.1.5 Síntese de sulfatação do acetato de hidroxitirosol efetuada com trióxido de enxofre.piridina em 1,4-dioxano

Na síntese de sulfatação do acetato de hidroxitirosol utilizou-se o procedimento descrito por Jones *et al.*, 2005, com pequenas alterações, com representa a figura abaixo.

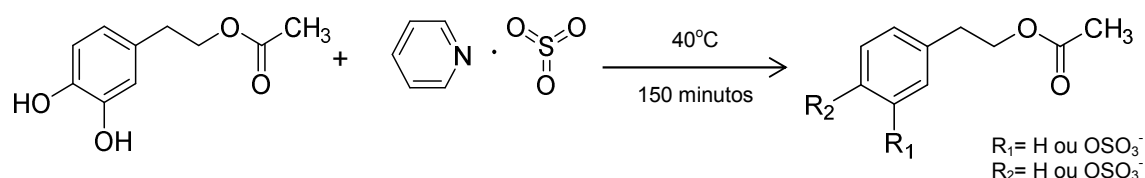


Figura 45- Síntese de sulfatação de acetato de hidroxitirosol

Tentou-se sintetizar o sulfato do acetato de de hidroxitirosol utilizando complexo de $\text{SO}_3\cdot\text{Py}$ em 1,4-dioxano, uma vez que na síntese do sulfato de cafeato de metilo se verificou o gasto quase completo do reagente inicial. Assim sendo, em termos de síntese, mostraram ser as melhores condições. Os problemas surgiram durante o isolamento dos sulfatos sintetizados, com a extensa degradação por hidrólise destes. Uma vez que o acetato de hidroxitirosol não apresenta na sua estrutura cadeia alifática uma ligação dupla e um grupo carbonilo em conjugação com o anel aromático, pensou-se que os sulfatos sintetizados poderiam ser menos lábeis e apresentando mais estabilidade.

Após o tempo de reação filtrou-se o dioxano por cânula sob atmosfera de argon e lavou-se com éter dietílico. Evaporam-se as fases etérea e de dioxano, e o produto resultante da evaporação foi identificado por TLC [$R_f=0,38$; DCM/metanol (35:2)] e ^1H -RMN como sendo acetato de hidroxitirosol.

Verificou-se por ^1H -RMN, que o sólido obtido após filtração continha essencialmente acetato de hidroxitirosol e apenas sais de piridina dos dois isómeros 3'-O-sulfato e 4'-O-sulfato do acetato de hidroxitirosol. Apesar da pequena quantidade, tentou-se separar por coluna os sulfatos da mistura reacional do mesmo modo que efectuado para os sulfatos do cafeato de metilo, adicionando-se às fracções contendo os sulfatos de acetato de hidroxitirosol dietilamina (DEA) para tentar estabiliza-los durante a evaporação do solvente. Por análise de ^1H -RMN do produto obtido por separação cromatográfica ($m = 140$ mg), verificou-se que este para além de conter piridina continha sais de DEA dos sulfatos 3'-O-sulfato do acetato de hidroxitirosol e 4'-O-sulfato do acetato de hidroxitirosol e acetato de hidroxitirosol nas proporções de 1,00:0,75:1,00, respectivamente, e ainda piridina (Fig. 47,

Tabela 8).

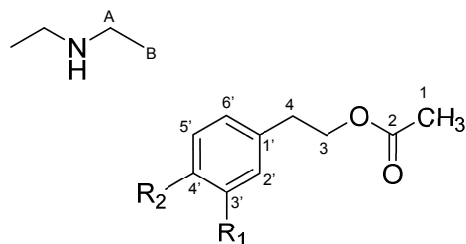


Figura 46- Estrutura de acetato de hidroxitirosol e seus metabolitos sulfatados

Nº do composto	R ₁	R ₂	Nome do composto
1	OH	OH	Acetato de hidroxitirosol
2a	OH	OSO ₃ ⁻	4'O-Sulfato
2b	OSO ₃ ⁻	OH	3'O-Sulfato

Tabela 8- Caracterização espectroscópica por ¹H-RMN da sulfatação do acetato de hidroxitirosol

Nº de ¹ H	Compostos								
	1			2a			2b		
	δ (ppm)	sinal	J (Hz)	δ (ppm)	sinal	J (Hz)	δ (ppm)	sinal	J (Hz)
5'	6,85	d	8,4	7,53	d	8,4	7,22	d	8,0
2'	6,81	d	2,0	7,53	d	2,0	7,20	d	2,4
6'	6,71	dd	2,0 e 6,0	7,03	dd	2,0 e 6,4	6,94	dd	2,0 e 6,4
3	4,23	t	6,8	4,26	t	6,8	4,22	t	6,8
4	2,84	t	6,8	2,92	t	6,8	2,86	t	6,8
1	2,02	s	-	2,04	s	-	2,03	s	-
A	-	-	-	3,03	q	7,2 e 7,6	3,03	q	7,2 e 7,6
B	-	-	-	1,29	t	7,2	1,29	t	7,2

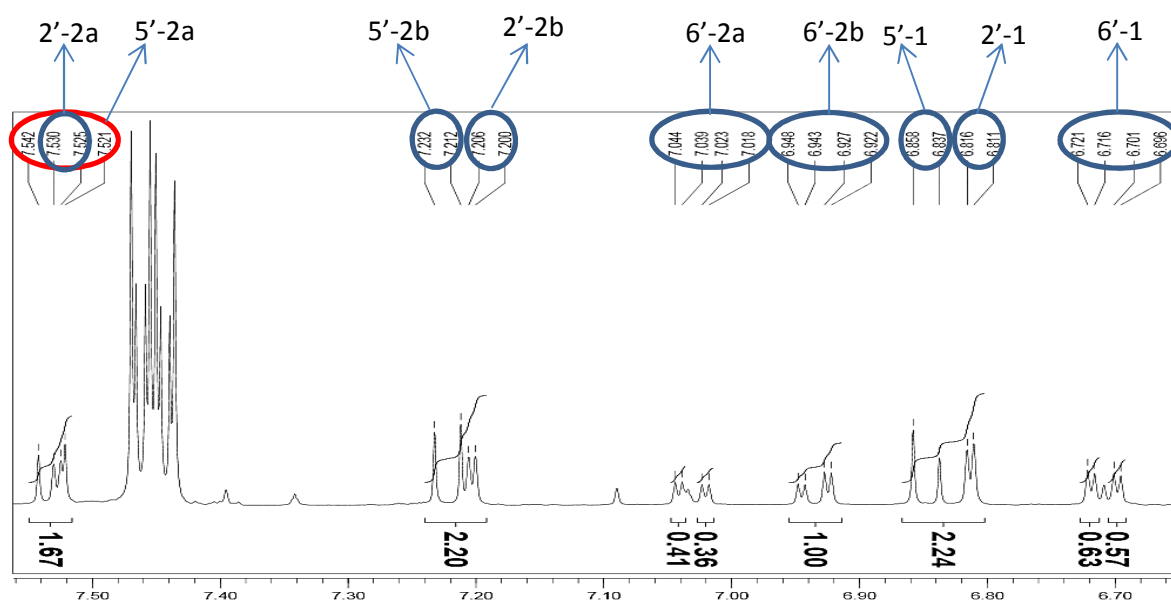


Figura 47- Intervalo do espectro de ¹H-RMN do sólido obtido da sulfatação do acetato de hidroxitirosol realizada com complexo SO₃.Py em 1,4-dioxano, onde é indicada a integração dos H-3, H-6' e H-5' dos vários compostos presentes

Também nesta molécula, apesar das ligeiras diferenças estruturais químicas relativamente ao cafeato de metilo, verifica-se que existe uma predisposição para a sulfatação do grupo hidroxilo na posição 3' em comparação com o 4'. Apesar das ditas diferenças estruturais, continua a existir uma maior distribuição eletrónica dos eletrões não ligantes do oxigénio na posição *para* quando comparado com o oxigénio na posição *meta*, o que aumenta o caráter nucleofílico do grupo hidroxilo na posição 3'.

5 CONCLUSÕES

Como se sabe é grande a ligação que sempre existiu entre o azeite e a dieta seguida pelos povos da bacia do Mediterrâneo, uma vez que esta sempre foi a fonte de gordura usada por excelência devido ao seu fácil acesso. A significativa baixa incidência em várias doenças, com maior destaque para as complicações cardiovasculares, nesta zona do globo despertou um grande interesse nos constituintes desta dieta. Assim sendo, a atenção dirigida ao azeite, numa fase incipiente, à sua fração saponificável e mais recentemente à sua fração minoritária hidrofílica, com especial destaque para os seus polifenóis, tem vindo crescer e a ser alvo de vários estudos.

Em vários estudos *in vitro* e *in vivo* verificou-se que estes compostos demonstraram possuir capacidade antioxidante e citoprotetora. No entanto, esta atividade está dependente da sua absorção e posterior metabolização.

Recentemente verificou-se que muitos dos metabolitos dos polifenóis do azeite se encontravam na sua forma sulfatada, e que o metabolito identificado em maior concentração no plasma após a ingestão de azeite também se encontra sob esta forma, o que indica que a sulfatação é uma das principais vias metabólicas do organismo, ao contrário do que era pensado inicialmente, tendo havido então inicialmente um maior interesse nos metabolitos de fase II metilados e glucoronidados.

Tendo em conta a importância que os metabolitos sulfatados parecem ter, entendeu-se ser de grande importância obtê-los por meio de síntese para perceber, em estudos futuros, qual a sua contribuição para a capacidade citoprotetora conferida pelos polifenóis do azeite, bem como para serem utilizados como padrões em futuros estudos de biodisponibilidade. Assim tentaram-se aplicar vários métodos de sulfatação descritos para compostos que possuem na sua estrutura molecular estruturas catecólicas e verificou-se qual deles se adequa melhor à sulfatação dos polifenóis do azeite, mais concretamente do hidroxitirosol e do acetato de hidroxitirosol. Devido ao custo elevado dos reagentes necessários à síntese do acetato de hidroxitirosol, optou-se por testar e otimizar as condições reacionais num composto estruturalmente semelhante ao acetato de hidroxitirosol e com um custo de síntese consideravelmente mais baixo, como foi o caso do cafeato de metilo.

Verificou-se que efetivamente vários métodos de sulfatação foram eficazes na síntese dos metabolitos, tendo-se obtido misturas contendo o 3'O e o 4'O sulfatos de cafeato de metilo, com o total gasto do reagente inicial (cafeato de metilo). Verificou-se também que a estrutura catecólica teve maior apetência para sofrer sulfatação na posição

meta, o que se explica pelo maior carácter nucleofílico do oxigénio nesta posição.

No entanto, nunca foi possível isolar os sulfatos da mistura reacional, mesmo tendo-se realizando algumas alterações nos procedimentos.

Essencialmente verificaram-se dois problemas no isolamento dos isómeros 3'-O e 4'-O sulfatados: a presença de sais de piridina do complexo utilizado durante a síntese, e decomposição sofrida pelos compostos sulfatados com produção de trióxido de enxofre e reagente polifenólicos inicial.

O desafio futuro passa por inicialmente conseguir isolar os compostos 3'-O-sulfatado e 4'-O-sulfatado da mistura reacional e posteriormente separar os dois isómeros. Uma vez alcançada a separação dos dois isómeros, poder-se-à sujeitar o composto sulfatado a estudos de bioatividade e biodisponibilidade para melhor se compreender a sua atividade, já que pouco ou nada se sabe sobre este aspeto, nomeadamente sobre a sua capacidade de proteção de eritrócitos e LDL's sujeitos a stress oxidativo.

Pessoalmente, e numa perspetiva de aprendizagem, acharia interessante continuar com este tema, alargando-o a outros polifenóis já conhecidos do azeite. Esta área, dos benefícios do azeite, encontra-se constantemente debaixo de foco e neste tema em específico, sulfatações, ainda existe um grande desconhecimento. Por ser um assunto incipiente é notória a falta de material bibliográfico, o que o torna ainda mais aliciante sabendo que se contribui como pioneiro.

6 Bibliografia

Acquaviva, R., Giacomo, C., Sorrenti, V., Galvano, F., Cardile, V., Gangia, S., Antiproliferative effect of oleuropein in prostate cell lines, *Int. J. Oncol.*, **2012**, *41*, 31-38.

Antolovich, M., Prenzler, P. D., Patsalides, E., McDonald, S., Robards, K., Methods for testing antioxidant activity, *The Analyst*, **2002**, *127*, 183-198.

Aparicio, R., Roda, L., Albi, M. A., Gutiérrez, F., Effect of Various Compounds on Virgin Olive Oil Stability Measured by Rancimat, *J. Agr. Food Chem.*, **1999**, *47*, 4150-4155.

Aviram, M., Interaction of oxidized low density lipoprotein with macrophages in atherosclerosis, and the anti-atherogenicity of antioxidants. *Eur. J. Clin. Chem. Clin.*, **1996**, *34*, 599-608.

Bartsch, H., Nair, J., Owen, R. W., Dietary polyunsaturated fatty acids and cancers of the breast and colorectum: emerging evidence for their role as risk modifiers, *Carcinogenesis*, **1999**, *20*, 2209-2218.

Bakke, J. M., Sletvold, I., Substitution reactions of 5-nitropyridine-2-sulfonic acid. A new pathway to 2,5-disubstituted pyridines, *Org. Biomol. Chem.*, **2003**, *1*, 2710-2715.

Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S., Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses, *Food Chem.*, **2006**, *99*, 191-203.

Bamford, C.H., Tipper, C.F.H., Ester formation and hydrolysis and related reaction, Elsevier, **1972**.

Baraldi, P. G., Simoni, D., Manfredini, S., Menziani, E., Preparation of 3,4-dihydroxy-1-benzeneethanol-A reinvestigation, *Liebigs ann. Chem.*, **1983**, *4*, 684-686.

Beauchamp, G. K., Keast, R. S. J., Morel, D., Lin, J., Pika, J., Han, Q., Lee, CH., Smith, A. B., Breslin, P. A. S., Ibuprofen-like activity in extra-virgin olive oil, *Nature*, **2005**, *437*, 45-46.

Bendini, A., Cerretani, L., Carrasco-Pancorbo, A., Gómez-Caravaca, A. M., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A., Lercker, G., Phenolic molecules in virgin olive oils: a survey of their sensory properties, health effects, antioxidante activity and analytical

methods. An overview of the last decade, *Molecules*, **2007**, *12*, 1679-1719.

Bisignano, G., Tomaino, A., Cascio, R., Crisafi, G., Uccella, N., Saija, A., On the in-vitro antimicrobial activity of oleuropein and hydroxytyrosol, *J. Pharm. Pharmacol.*, **1999**, *51*, 971-974.

Bianchi, G., Lipids and phenols in table olives, *Eur. J. Lipid Sci. Tech.*, **2003**, *105*, 229-242.

Borges, G., Mullen, W., Mullan, A., Lean, M. E. J., Roberts, S. A., Crozier, A., Bioavailability of multiple components following acute ingestion of a polyphenol-rich juice drink, *Mol. Nutr. Food Res.*, **2010**, *54*, S268-S277.

Boskou, D., Química y tecnología del aceite de oliva, *AOCS Press*, 1ª edição, Illinois, **1998**, 67-104.

Boskou, D., Sources of natural phenolic antioxidants, *Trends Food Sci. Tech.*, **2006**, *17*, 505-512.

Bowman, K. G., Bertozzi, C. R., Carbohydrate sulfotransferases: mediators of extracellular communication, *Chem. Biol.*, **1999**, *6*, R9-R22.

Bravo, L., Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance, *Nutr. Ver.*, **1998**, *56*, 317-333.

Brugè, F., Bacchetti, T., Principi, F., Scarpa, E. S., Littarru, G. P., Tiano, L., Olive oil supplemented with coenzyme Q10: Effects on plasma and lipoprotein oxidative status, *Biofactors*, **2012**, *38*, 249-256.

Carrillo, C., Cavia, M. M., Alonso-Torre, S. R., Antitumor effect of oleic acid; mechanisms of action. A review, *Nutrición Hospitalaria*, **2012**, *27*, 1860-1865.

Carrasco-Pancorbo, A., Cerretani, L., Bendini, A., Segura-Carretero, A., Lercker, G., Fernández-Gutiérrez, G., Evaluation of the influence of thermal oxidation on the phenolic composition and on the antioxidant activity of extra-virgin olive oils, *J. Agr. Food Chem.*, **2007**, *55*, 4771-4780.

Castañer, O., Covas, M. I., Khymenets, O., Nyyssonen, K., Konstantinidou, V., Zunft, H. F., de la Torre, R., Muñoz-Aguayo, D., Vila, J., Fitó, M., Protection of LDL from oxidation by olive oil polyphenols is associated with a downregulation of CD40-ligand expression and its downstream products in vivo in humans, *Am. J. Clin. Nutr.*, **2012**, *95*, 1238-1244.

Cicerale, S., Conlan, X. A., Sinclair, A. J., Keast, B. S. J., Chemistry and health of olive oil phenolics, *Cri. Rev. Food Sci.*, **2009**, *49*, 218-236.

Cicerale, S., Lucas, L., Keast, R., Biological Activities of Phenolic Compounds Present in Virgin Olive Oil, *Int. J. Mol. Sci.*, **2010**, *11*, 458-479.

Consensus report, International conference on the healthy effect of virgin olive oil, *Eur. J. Clin. Invest.*, **2005**, *35*, 421-424.

Covas M. I., Olive oil and the cardiovascular system, *Pharmacol. Res.*, **2007**, *55*, 175-186.

Correa, J. A. G., López-Villodres, J. A., Asensi, R., Espartero, J. L., Rodríguez-Gutiérrez, G., De La Cruz, J. P., Virgin olive oil polyphenol hydroxytyrosol acetate inhibits in vitro platelet aggregation in human whole blood: comparison with hydroxytyrosol and acetylsalicylic acid, *Brit. J. Nutr.*, **2009**, *101*, 1157-1164.

Crozier, A., Jaganath, I. B., Clifford, M. N., Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health, *Nat. Prod. Rep.*, **2009**, *26*, 1001-1043.

D'Archivio, M., Filesi, C., Vari, R., Scazzocchio, B., Masella, R., Bioavailability of the polyphenols: Status and controversies, *Int. J. Mol. Sci.*, **2010**, *11*, 1321-1342.

de la Torre, R., Bioavailability of olive oil phenolic compounds in humans, *Inflammopharmacology*, **2008**, *16*, 245-247.

Dimitrios, B., Sources of natural phenolic antioxidants, *Trends Food Sci. Tech.*, **2006**, *17*, 505-512.

Dinda, B., Debnath, S., Harigaya, Y., Naturally occurring iridoids. A review, Part 1, *Chem. Pharm. Bull.*, **2007**, *55*, 159-222.

Dueñas, M., González-Manzano, S., González-Paramás, A., Santos-Buelga, C., Surco-Laos, F., Characterization of sulfated quercetin and epicatechin metabolites, *J. Agr. Food Chem.*, **2012**, 60, 3592–3598.

Elamin, M. H., Daghestani, M. H., Omer, S. A., Elobeid, M. A., Virk, P., Al-Olayan, E. M., Hassan, Z. K., Mohammed, O. B., Aboussekhra, A., Olive oil oleuropein has anti-breast cancer properties with higher efficiency on ER-negative cells, *Food Chem. Toxicol.*, **2013**, 53, 310-316.

El, S. N., Karakaya, S., Olive tree (*Olea europaea*) leaves: potential beneficial effects on human health, *Nutr. Res.*, **2009**, 67, 632-638.

Fabiani, R., Bartolomeo, A., Rosignoli, P., Servili, M., Selvaggini, R., Montedoro, G. F., Saverio, C., Morozzi, G., Virgin Olive Oil Phenols Inhibit Proliferation of Human Promyelocytic Leukemia Cells (HL60) by Inducing Apoptosis and Differentiation, *The J. Nutr.*, **2006**, 136, 614-619.

Fabiani, R., Bartolomeo, A., Rosignoli, P., Servili, M., Montedoro, G. F., Morozzi, G., Fuccelli, R., Oxidative DNA damage is prevented by extracts of olive oil, hydroxytyrosol, and other olive phenolic compounds in human blood mononuclear cells and HL60 cells, *J. Nutr.*, **2008**, 138, 1411-1416.

Falany, C. N., Introduction: Changing view of sulfation and cytosolic sulfotransferases, *FASEB J.*, **1997**, 11, 1-2.

Falany, C. N., Enzymology of human cytosolic sulfotransferases, *FASEB J.*, **1997**, 11, 206-216.

Fernandéz-Bolaños, J., Rodríguez, G. R. R., Heredia, A., Guillén, R., Jiménez, A., Production in large quantities of highly purified hydroxytyrosol from liquid-solid waste of two-phase olive oil processing or “Alperujo”, *J. Agr. Food Chem.*, **2002**, 50, 6804-6811.

Ferrara, L. A., Raimondi, A.S., Episcopo, L., Guida, L., Russo, A. D., Marotta, T., Olive oil and reduced need for antihypertensive medications, *Arch. Intern. Med.*, **2000**, 160, 837-842.

Fitó, M., Covas, M. I., Lamuela-Raventós, R. M., Vila, J., Torrents, J., de la Torre, C.,

Marrugat, J., Protective effect of olive oil and Its phenolic compounds against low density lipoprotein oxidation, *Lipids*, **2000**, 35, 633-638.

Ghisalberti, E. L., Biological and pharmacological activity of naturally occurring iridoids and secoiridoids, *Phytomedicine*, **1998**, 5, 147-163.

Ghanbari, R., Anwar, F., Alkharfy, K. M., Gilani, A. H., Saari, N., Valuable nutrients and functional bioactives in different parts of olive (*Olea europaea* L.) - A review, *Int. J. Mol. Sci.*, **2012**, 13, 3291-3340.

Giovacchino, L. D., Costantini, N., Ferrante, M. L., Serraiocco, A., Influence of malaxation time of olive paste on oil extraction yields and chemical and organoleptic characteristics of virgin olive oil obtained by a centrifugal decanter at water saving, *Grasas y Aceites*, **2002**, 53, 179-186.

González-Correa, J. A., Navas, M. D., Muños-Marín, J., Trujillo, M., Fernández-Bolaños, J., de la Cruz, J. P., Effects of hydroxytyrosol and hydroxytyrosol acetate administration to rats on platelet function compared to acetylsalicylic acid, *J. Agr. Food Chem.*, **2008**, 56, 7872-7876.

González-Manzano, S., González-Paramás, A., Santos-Buelga, C., Dueñas, M., Preparation and characterization of catechin sulfates, glucuronides, and methylethers with metabolic interest, *J. Agr. Food Chem.*, **2009**, 57, 1231-1238.

Hard, W. B., Scalera, M., Separation of Mixtures with Triethylamine-Sulfur Trioxide, *J. Am. Chem. Soc.*, **1952**, 74, 5212-5214.

Harwood, J. L., Yaqoob, P., Nutritional and health aspects of olive oil, *Eur. J. Lipid Sci. Tech.*, **2002**, 104, 685-697.

Hassan, H. E., ElRahman, A. A. A., Attia, M. M., Color Properties Of Olive Fruits During Its Maturity Stages Using Image Analysis, *AIP Conf. Proc.*, **2011**, 1380, 101-106.

Hirano, T., Oguri, K., Yoshimura, H., Synthesis and pharmacological activity of sulfate conjugates at 6-position N-substituted normorphine derivatives, *Chem. Pharm. Bull.*, **1991**, 39, 2000-2004.

Horrocks, L. A., Yeo, Y. K., Health benefits of docosahexaenoic acid (DHA), *Pharmacol. Res.*, **1999**, *40*, 211-225.

Hoshino, J., Park, E. J., Kondratyuk, T. P., Marler, L., Pezzuto, J. M., van Breemen, R. B., Mo, S., Li, Y., Cushman, M., Selective synthesis and biological evaluation of sulfate-conjugated resveratrol metabolites, *J. Med. Chem.*, **2010**, *53*, 5033-5043.

Horton, H. R., Tucker, W. P., Dimethyl(2-hydroxy-5- itrobenzyl) sulfonium Salts, *J. Biol. Chem.*, **1970**, *245*, 3397-3401.

Ichihashi, M., Ueda, M., Budiyanto, A., Bito, T., Oka, M., Fukunaga, M., Tsuru, K., Horikawa, T., UV-induced skin damage, *Toxicology*, **2003**, *189*, 21-39.

Ingram, L. J., Desoky, A., Ali, A. M., Taylor, S. D., O- and N-Sulfations of Carbohydrates Using Sulfuryl Imidazolium Salts, *J. Org. Chem.*, **2009**, *74*, 6479-6485.

Jemai, H., El Feki, A., Sayadi, S., Antidiabetic and Antioxidant Effects of Hydroxytyrosol and Oleuropein from Olive Leaves in Alloxan-Diabetic Rats, *J. Agr. Food Chem.*, **2009**, *57*, 8798-8804.

Jones, D. J. L., Jukes-Jones, R., Verschoyle, R.D., Farmer, P.B., Gescher, A., A synthetic approach to the generation of quercetin sulfates and the detection of quercetin 3'-O-sulfate as a urinary metabolite in the rat, *Bioorgan. Med. Chem.*, **2005**, *13*, 6727-6731.

Kamal-Eldin, A., Effect of fatty acids and tocopherols on the oxidative stability of vegetable oils, *Eur. J. Lipid Sci. Tech.*, **2006**, *58*, 1051-1061.

Khymenets, O., Joglar, J., Clapés, P., Parella, T., Covas, M. I., de la Torre, R., Biocatalyzed synthesis and structural characterization of monoglucuronides of hydroxytyrosol, tyrosol, homovanillic alcohol, and 3-(4'-hydroxyphenyl)propanol, *Adv. Syn. Catal.*, **2006**, *348*, 2155-2162.

Khymenets, O., Fitó, M., Touriño, S., Muñoz-Aguayo, D., Pujadas, M., Torres, J. L., Joglar, J., Farré, M., Covas M. I., de la Torre, R., Antioxidant activities of hydroxytyrosol main

metabolites do not contribute to beneficial health effects after olive oil ingestion, *Drug Metab. Dispos.*, **2010**, 38, 1417-1421.

Khymenets, O., Farré, M., Pujadas, M., Ortiz, E., Joglar, J., Covas, M. I., de la Torre, R., Direct analysis of glucuronidated metabolites of main olive oil phenols in human urine after dietary consumption of virgin olive oil, *Food Chem.*, **2011**, 126, 306-314.

Konstantinidou, V., Covas, M. I., Muñoz-Aguayo, D., Khymenets, O., de la Torre, R., Saez, G., Tormos, M. C., Toledo, E., Marti, A., Ruiz-Gutiérrez, V., Mendez, M. V. R., Fitó, M., In vivo nutrigenomic effects of virgin olive oil polyphenols within the frame of the Mediterranean diet: a randomized controlled trial, *FASEB J.*, **2010**, 24, 2546-2557.

Kountouri, A. M., Mylona, A., Kaliora, A. C., Andrikopoulos, N. K., Bioavailability of the phenolic compounds of the fruits (drupes) of *Olea europaea* (olives): Impact on plasma antioxidant status in humans, *Phytomedicine*, **2007**, 14, 659-667.

Kueh, J. T. B., O'Connor, P. D., Hügel, H., Brimble, M. A., Synthetic studies towards the anti-inflammatory agent, oleocanthal using a Johnson–Claisen (orthoester) rearrangement strategy, *ARKIVOC*, **2009**, 7, 58-71.

Kurogi, K., Alazizi, A., Liu, M. Y., Sakakibara, Y., Suiko, M., Sugahara, T., Liu, M. C., Concerted actions of the catechol O-methyltransferase and the cytosolic sulfotransferase SULT1A3 in the metabolism of catecholic drugs, *Biochem. Pharmacol.*, **2012**, 84, 1186-1195.

Kush, D., Sulfur trioxide-pyridine complex: A versatile organic reagent, *Speciality Chemical Magazine*, Disponível em: <http://www.cabb-chemicals.com>, acesso em Dezembro de **2006**.

Kushi, L., Giovannucci, E., Dietary Fat and Cancer, *Am. J. Med.*, **2002**, 113, 63-70.

Lavelli, V., Bondesan, L., Secoiridoids, tocopherols, and antioxidant activity of monovarietal extra virgin olive oils extracted from destoned fruits, *J. Agr. Food Chem.*, **2005**, 53, 1102-1107.

Learmonth, D. A., Freitas, A. P., Chemical synthesis and characterization of conjugates of a novel catechol-O-methyltransferase inhibitor, *Bioconjugate Chem.*, **2002**, 13, 1112-1118.

Lidon, F. J., Silvestre, M. M., Indústrias alimentares – Aditivos e tecnologia, *Escolar editora*, **2007**, 49-53, 143, 144, 252-259.

Liu, Y., Lien, I. F. F., Ruttgaizer, S., Dove, P., Taylor, S. D., Synthesis and protection of aryl sulfates using the 2,2,2-trichloroethyl moiety, *Org. Lett.*, **2004**, 6, 209-212.

López-Miranda, J., Gaforio, J. J., Solá, R., Visioli, F., Olive oil and health: Summary of the II international conference on olive oil and health consensus report, Jaén and Córdoba (Spain) 2008, *Nutr. Metab. Cardiovas.*, **2010**, 20, 284-294.

Luchetti, F., Importance and future of olive oil in the world market - an introduction to olive oil, *Eur. J. Lipid Sci. Tech.*, **2002**, 104, 559-563.

Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., Jiménez, L., Polyphenols: food sources and bioavailability, *Am. J. Clin. Nutr.*, **2004**, 79, 727-747.

Mateos, R., Espartero, J. L., Trujillo, M., Ríos, J. J., León-Camacho, M., Alcudia, F., Cert, A., Determination of phenols, flavones, and lignans in virgin olive oils by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with diode array ultraviolet detection, *J. Agr. Food Chem.*, **2001**, 49, 2185-2192.

Menezes, J. C. J. M. D. S., Kamat, S. P., Cavaleiro, J. A. S., Gaspar, A., Garrido, J., Borges, F., Synthesis and antioxidant activity of long chain alkyl hydroxycinnamates, *Eur. J. Med. Chem.*, **2011**, 46, 773-777.

Migliorini, M., Cecchi, L., Cherubini, C., Trapani, S., Cini, E., Zanoni, B., Understanding degradation of phenolic compounds during olive oil processing by inhibitor addition, *Eur. J. Lipid Sci. Tech.*, **2012**, 114, 942-950.

Mikula, H., Sohr, B., Skrinjar, P., Weber, J., Hametner, C., Berthiller, F., Krska, R., Adam, G., Fröhlich, J., Sulfation of β -resorcylic acid esters-first synthesis of zearalenone-14-sulfate, *Tetrahedron Lett.*, **2013**, 54, 3290-3293.

Miro-Casas, E., Covas, M. I., Farre, M., Fitó, M., Ortuño, J., Weinbrenner, T., Roset, P., de la Torre, R., Hydroxytyrosol Disposition in Humans, *Clin. Chem.*, **2003**, 49, 945-952.

Morales, M. T., Rios, J. J., Aparicio, R., Changes in the volatile composition of virgin olive oil during oxidation: Flavors and off-flavors, *J. Agr. Food Chem.*, **1997**, 45, 2666-2673.

Nishimura, S. I., Kai, H., Shinada, K., Yoshida, T., Tokura, S., Kurita, K., Nakashima, H., Yamamoto, N., Uryu, T., Regioselective syntheses of sulfated polysaccharides: specific anti-HIV-1 activity of novel chitin sulfates, *Carbohydr. Res.*, **1998**, 306, 427-433.

Owen, R. W., Giacosa, A., Hull, W. E., Haubner, R., Spiegelhalder, B., Bartsch, H., The antioxidant/anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil, *Eur. J. Cancer*, **2000**, 36, 1235-1247.

Owen, R. W., Giacosa, A., Hull, W. E., Haubner, R., Würtele, G., Spiegelhalder, B., Bartsch, H., Olive-oil consumption and health: the possible role of antioxidants, *Lancet Oncol.*, **2000**, 1, 107-112.

Paiva-Martins, F., Gordon, M. H., Isolation and characterization of the antioxidant component 3,4-dihydroxyphenylethyl 4-formyl-3-formylmethyl-4-hexenoate from olive (*Olea europaea*) leaves, *J. Agr. Food Chem.*, **2001**, 49, 4214-4219.

Maria F. Paiva-Martins, Olive oil antioxidants, Tese de doutoramento, **2002**.

Paiva-Martins, F., Gordon, M. H., Interactions of ferric ions with olive oil phenolic compounds, *J. Agr. Food Chem.*, **2005**, 53, 2704-2709.

Paiva-Martins, F., Santos, V., Mangericao, H., Gordon, M. H., Effects of copper on the antioxidante activity of olive oil polyphenols in bulk oil and oil-in-water emulsions, *J. Agr. Food Chem*, **2006**, 54, 3738-3743.

Paiva-Martins, F., Fernandes, J., Santos, V., Silva, L., Borges, F., Rocha, S., Belo, L., Santos-Silva, A., Powerful Protective Role of 3,4-Dihydroxyphenylethanol-Elenolic Acid Dialdehyde against Erythrocyte Oxidative-Induced Hemolysis, *J. Agr. Food Chem.*, **2010**, 58, 135-140.

Paiva-Martins, F., Silva, A., Almeida, V., Carvalheira, M., Serra, C., Rodrigues-Borges, J. E., Fernandes, J., Belo, L., Santos-Silva, A., Protective Activity of Hydroxytyrosol Metabolites on

Erythrocyte Oxidative-Induced Hemolysis, *J. Agr. Food Chem.*, **2013**, *61*, 6636-6642.

Pauwels, E. K. J., The protective effect of the mediterranean diet: focus on cancer and cardiovascular risk, *Med. Prin. Pract.*, **2011**, *20*, 103-111.

Pehlivan, L., Métaay, E., Boyron, O., Demonchaux, P., Mignani, G., Lemaire, M., A new solvent-free reaction for the preparation of alkoxysilane from cyclic ethers, alcohols, or carbonyl compounds, *Eur. J. Org. Chem.*, **2011**, 4687-4692.

Pereira, J. A., Pereira, A. P. G., Ferreira, I. C. F. R., Valentão, P., Andrade, P. B., Seabra, R., Estevinho, L., Bento, A., Table olives from Portugal: Phenolic compounds, antioxidante potential, and antimicrobial activity, *J. Agr. Food Chem.*, **2006**, *54*, 8425-8431.(a)

Pereira, J. A., Casal, S., Bento, A., Oliveira, M. B. P. P., Influence of olive storage period on oil quality of three portuguese cultivars of *Olea europea*, Cobrançosa, Madural, and Verdeal Transmontana, *J. Agr. Food Chem.*, **2002**, *50*, 6335-6340.(b)

Pereira-Caro, G., Mateos, R., Traka, M. H., Bacon, J. R., Bongaerts, R., Sarriá, B., Bravo, L., Kroon, P. A., Hydroxytyrosyl ethyl ether exhibits stronger intestinal anticarcinogenic potency and effects on transcript profiles compared to hydroxytyrosol, *Food Chem.*, **2013**, *138*, 1172-1182.

Pérez-Jiménez, F., Ruano, J., Perez-Martinez, P., Lopez-Segura, F., Lopez-Miranda, J., The influence of olive oil on human health: not a question of fat alone, *Mol. Nutr. Food Res.*, **2007**, *51*, 1199-1208.

Petroni, A., Blasevich, M., Salami, M., Papini, N., Montedoro, G. F., Galli, C., Inhibition of platelet aggregation and eicosanoid production by phenolic components of olive oil, *Thromb. Res.*, **1995**, *78*, 151-160.

Piersanti, G., Retini, M., Espartero, J. L., Madrona, A., Zappia, G., An efficient, economical synthesis of hydroxytyrosol and its protected forms via Baeyer–Villiger oxidation, *Tetrahedron Lett.*, **2011**, *52*, 4938-4940.

Pinto, J., Paiva-Martins, F., Corona, G., Debnam, E. S., Oruna-Concha, M. J., Vauzour, D., Gordon, M. H., Spencer, J. P. E., Absorption and metabolism of olive oil secoiridoids in the

small intestine, *Brit. J. Nutr.*, **2011**, *105*, 1607-1618.

Pitt, J., Roth, W., Lacor, P., Smith, A. B., Blankenship, M., Velasco, P., De Felice, F., Breslin, P., Klein, W. L., Alzheimer's-associated A β oligomers show altered structure, immunoreactivity and synaptotoxicity with low doses of oleocanthal, *Toxicol. Appl. Pharma.*, **2009**, *240*, 189-197.

Quirantes-Piné, R., Zurek, G., Barrajón-Catalán, E., Bäßmann, C., Micol, V., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A., A metabolite-profiling approach to assess the uptake and metabolism of phenolic compounds from olive leaves in SKBR3 cells by HPLC–ESI–QTOF-MS, *J. Pharmaceut. Biomed.*, **2013**, *72*, 121-126.

Riachy, M. E., Priego-Capote, F., León, L., Rallo, L., Castro, M. D. L., Hydrophilic antioxidants of virgin olive oil. Part 1: Hydrophilic phenols: A key factor for virgin olive oil quality, *Eur. J. Lipid Sci. Tech.*, **2011**, *113*, 678-691.

Robards, K., Prenzler, P. D., Tucker, G., Swatsitang, P., Glover, W., Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits, *Food Chem.*, **1999**, *66*, 401-436.

Romero, C., Medina, E., Vargas, J., Brenes, M., Castro, A., In vitro activity of olive oil polyphenols against helicobacter pylori, *J. Agr. Food Chem.*, **2007**, *55*, 680-686.

Rosignoli, P., Fuccelli, R., Fabiani, R., Servili, M., Morozzi, G., Effect of olive oil phenols on the production of inflammatory mediators in freshly isolated human monocytes, *J. Nutr. Biochem.*, **2013**, *24*, 1513-1519.

Ruano, J., Lopez-Miranda, J., Fuentes, F., Moreno, J. A., Bellido, C., Perez-Martinez, P., Lozano, A., Gómez, P., Jiménez, Y., Jiménez, F. P., Phenolic content of virgin olive oil Improves ischemic reactive hyperemia in hypercholesterolemic patients, *J. Am. Coll. Cardiol.*, **2005**, *46*, 1864-1868.

Ruano, J., López-Miranda, J., de la Torre, R., Delgado-Lista, J., Fernández, J., Caballero, J., Covas, M. I., Jiménez, Y., Pérez-Martínez, P., Marín, C., Fuentes, F., Pérez-Jiménez, F., Intake of phenol-rich virgin olive oil improves the postprandial prothrombotic profile in hypercholesterolemic patients, *Am. J. Clin Nutr.*, **2007**, *86*, 341-346.

Rubió, L., Macià, A., Valls, R. M., Pedret, A., Romero, M. P., Solà, R., Motilva, M. J., A new

hydroxytyrosol metabolite identified in human plasma: Hydroxytyrosol acetate sulfate, *Food Chem.*, **2012**, *134*, 1132-1136.(a)

Rubió, L., Valls, R. M., Macià, A., Pedret, A., Giralt, M., Romero, M. P., de la Torre, R., Covas, M. I., Solà, R., Motilva, M. J., Impact of olive oil phenolic concentration on human plasmatic phenolic metabolites, *Food Chem.*, **2012**, *135*, 2922-2929.(b)

Rubio-Senent, F., Rodríguez-Gutiérrez, G., Lama-Muñoz, A., Fernández-Bolaños, J., Phenolic extract obtained from steam-treated olive oil waste: Characterization and antioxidant activity, *LWT - Food Sci. Tech.*, **2013**, *54*, 114-124.

Ryan, D., Antolovich, M., Prenzler, P., Robards, K., Lavee, S., Biotransformation in phenolic compounds in *Olea europaea* L., *Scientia Horticulturae*, **2002**, *92*, 147-176.

Sánchez-Moreno, C., Larrauri, J. A., Saura-Calixto, F., A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols, *J. Sci. Food Agric.*, **1998**, *76*, 270-276.

Servili, M., Montedoro, G., Contribution of phenolic compounds to virgin olive oil quality, *Eur. J. Lipid Sci. Tech.*, **2002**, *104*, 602-613.

Servili, M., Esposto, S., Fabiani, R., Urbani, S., Taticchi, A., Mariucci, F., Selvaggini, R., Montedoro, G. F., Phenolic compounds in olive oil: antioxidant, health and organoleptic activities according to their chemical structure, *Inflammopharmacology*, **2009**, *17*, 76-84.

Silva, M. L. C., Costa, R. S., Santana, A. S., Koblitz M. G. B., *Semina: Ciências Agrárias*, **2010**, *31*, 669-682.

Smith, A. B., Sperry, J. B., Han, Q., Syntheses of (-)-oleocanthal, a natural NSAID found in extra virgin olive oil, the (-)-deacetoxy-oleuropein aglycone, and related analogues, *J. Org. Chem.*, **2007**, *72*, 6891-6900.

Soler, A., Romero, M. P., Macià, A., Saha, S., Furniss, C. S. M., Kroon, P. A., Motilva, M. J., Digestion stability and evaluation of the metabolism and transport of olive oil phenols in the human small-intestinal epithelial Caco-2/TC7 cell line, *Food Chem.*, **2010**, *119*, 703-714.

Soobrattee, M. A., Neergheen, V. S., Luximon-Ramma, A., Aruoma, O. I., Bahorun, T., Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions, *Mutat. Res.*, **2005**, *579*, 200-213.

Stark, A. H., Madar, Z., Olive oil as a functional food: epidemiology and nutritional approaches, *Nutr. Res.*, **2002**, *60*, 170-176.

Stefanouadaki, E., Kotsifaki, F., Koutsaftakis, A., Sensory and chemical profiles of three European olive varieties (*Olea europea* L); an approach for the characterisation and authentication of the extracted oils, *J. Sci. Food and Agric.*, **2000**, *80*, 381-389.

Suárez, M., Valls, R. M., Romero, M. P., Macià, A., Fernández, S., Giralt, M., Solà, R., Motilva, M. J., Bioavailability of phenols from a phenol-enriched olive oil, *Brit. J. Nutr.*, **2011**, *106*, 1691-1701.

Tripoli, E., Giammanco, M., Tabacchi, G., Majo, D. D., Giammanco, S., Guardia, M. L., The phenolic compounds of olive oil: structure, biological activity and beneficial effects on human health, *Nutr. Res. Rev.*, **2005**, *18*, 98-112.

Tuck, K. L., Hayball, P. J., Major phenolic compounds in olive oil: metabolism and health effects, *J. Nutr. Biochem.*, **2002**, *13*, 636-644.

Velasco, J., Dobarganes, C., Oxidative stability of virgin olive oil, *Eur. J. Lipid Sci. Tech.*, **2002**, *104*, 661-676.

Visioli, F., Galli, C., Bellomo, G., Montedoro, G., Low density lipoprotein oxidation is inhibited in vitro by olive oil constituents, *Atherosclerosis*, **1995**, *117*, 25-32.

Visioli, F., Galli, C., Olive oil phenols and their potential effects on human health, *J. Agr. Food Chem.*, **1998**, *46*, 4292-4296.

Visioli, F., Galli, C., Bornet, F., Mattei, A., Patelli, R., Caruso, D., Olive oil phenolics are dose-dependently absorbed in humans, *FEBS Lett.*, **2000**, *458*, 159-160.

Visioli, F., Poli, A., Galli, C., Antioxidant and Other Biological Activities of Phenols from Olives and Olive Oil, *Inc. Med. Res. Ver.*, **2002**, *22*, 65-75.

Visioli, F., Bernardini, E., Extra virgin olive oil's polyphenols: Biological activities, *Curr. Pharm. Design*, **2011**, *17*, 786-804.

Visioli, F., Olive oil phenolics: Where do we stand? Where should we go?, *J. Sci. Food Agr.*, **2012**, *92*, 2017-2019.

Vissers, M. N., Zock, P. L., Roodenburg, A. J. C., Leenen, R., Katan, M. B., Olive Oil Phenols Are Absorbed in Humans, *J. Nutr.*, **2002**, *132*, 409-417.

Vissers, M. N., Zock, P. L., Katan, M. B., Bioavailability and antioxidant effects of olive oil phenols in humans: a review, *Eur. J. Clin. Nutr.*, **2004**, *58*, 955-965.

Vogl, H., Paper, D. H., Franz, G., Preparation of a sulfated linear (1→4)-β-D-galactan with variable degrees of sulfation, *Carbohydr. Polym.*, **2000**, 41, 185-190.

Xing, R., Liu, S., Yu, H., Guo, Z., Li, Z., Li, P., Preparation of high-molecular weight and high-sulfate content chitosans and their potential antioxidant activity in vitro, *Carbohydr. Polym.*, **2005**, 61, 148-154.

Yang, J., Luo, K., Li, D., Yu, S., Cai, J., Chen, L., Du, Y., Preparation, characterization and in vitro anticoagulant activity of highly sulfated chitosan, *Int. J. Biol. Macromol.*, **2013**, 52, 25-31.

Yoshida, T., Yasuda, Y., Mimura, T., Kaneko, Y., Nakashima, H., Yamamoto, N., Uryu, T., Synthesis of curdlan sulfates having inhibitory effects in vitro against AIDS viroses HIV-1 and HIV-2, *Carbohydr. Res.*, **1995**, 276, 425-436.

Warleta, F., Quesada, C. S., Campos, M., Allouche, Y., Beltrán, G., Gaforio, J. J., Hydroxytyrosol Protects against Oxidative DNA Damage in Human Breast Cells, *Nutrients*, **2011**, 3, 839-857.

Waterman, E., Lockwood, B., Active components and clinical applications of olive oil, *Altern. Med. Ver.*, **2007**, 12, 331-342.

Willett, W.C., The Mediterranean diet: science and practice, *Public Health Nutrition*, **2006**, 9, 105-110.

Zhang, K., Helm, J., Peschel, D., Gruner, M., Groth, T., Fischer, S., NMR and FT Raman characterisation of regioselectively sulfated chitosan regarding the distribution of sulfate groups and the degree of substitution, *Polymer*, **2010**, 51, 4698-4705.

Zhang, J., Hu, Y., Wang, D., Qin, T., Liu, C., Liu, X., Sheng, X., Chang, S., Fan, Y., Guo, L., Nguyen, T. L., The optimization of sulfation modification conditions for ophiopogonpolysaccharide based on antiviral activity, *Int. J. Biol. Macromol.*, **2012**, 51, 657-662.

Zhang, M., Jagdmann, G. E., Zandt, M. V., Sheeler, R., Beckett, P., Schroeter, H., Chemical synthesis and characterization of epicatechin glucuronides and sulfates: Bioanalytical standards for epicatechin metabolite identification, *J. Nat. Prod.*, **2013**, 76, 157-169.

Zou, Y., Khor, E., Preparation of sulfated-chitins under homogeneous conditions, *Carbohydr. Polym.*, **2009**, 77, 516-525.

Zrelli, H., Matsuoka, M., Kitazaki, S., Zarrouk, M., Miyazaki, H., Hydroxytyrosol reduces

intracellular reactive oxygen species levels in vascular endothelial cells by upregulating catalase expression through the AMPK–FOXO3a pathway, *Eur. J. Pharma.*, **2011**, 660, 275–282.
